

Jeremy Rott  
Dr. med.

## **Experimentelle Studien zur Calcium-Isotopenfraktionierung als quantitatives Maß der Knochenmineralisation**

Fach: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Claus Peter Schmitt

Störungen der Knochenmineralisation sind ein häufiges medizinisches Problem, die Diagnostik ist bisher jedoch begrenzt auf Serum- und Urin-Surrogatparameter, mit Strahlenbelastung einhergehende Bildgebung und invasive Biopsien. Eine potenzielle Alternative ist die Bestimmung der Ca-Isotopenverhältnisse in verschiedenen Kompartimenten des Körpers. Sie beruht auf den Prinzipien der kinetischen Isotopenfraktionierung, bei der natürlich vorkommende stabile Ca-Isotope als Funktion ihrer Masse in chemischen Reaktionen voneinander getrennt werden. Dabei reichert sich das isotopisch leichte  $^{42}\text{Ca}$  während der Mineralisation im Knochen an, im Blut verbleibt das schwerere  $^{44}\text{Ca}$ . Ebenso wird  $^{42}\text{Ca}$  bevorzugt intestinal aufgenommen und in der Niere tubulär rückresorbiert. Das Isotopenverhältnis  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  in Blut und Urin ermöglicht demnach mittels entsprechenden mathematischen Kompartiment-Modellen Rückschlüsse auf den Knochen-Kalzifizierungsprozess.

Allerdings sind einige, für die klinische Anwendung wichtige Fragen bisher unbeantwortet: Welche zellulären Mechanismen sind für die Ca-Isotopenfraktionierung verantwortlich? Inwieweit stimmen die Ca-Isotopenverhältnisse der Kompartimente mit den tatsächlich aufgetretenen Mineralisationsprozessen des Knochens überein? Wie reagiert das Isotopenverhältnis auf kurzzeitige Änderungen der Serum-Ca-Konzentration?

Um diese Fragen zu beantworten wurden *in vitro* die Ca-Fraktionierungsprozesse durch aktivierte Osteoblasten und Osteoklasten sowie bei Ca-Eiweißbindung analysiert. Bei Ratten wurden longitudinal Ca-Isotopenmessungen in Kot, Urin, Serum und Knochen bei Ernährung mit physiologischer und 50 % Ca-reduzierter Diät durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch parallele Quantifizierung der absoluten Ca-Bilanzen, durch histologische Analysen und pQCT validiert, die Ca-Isotopenverhältnisse mittels Multikollektor-Ionisations-gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie gemessen.

So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Bildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten zu Ca-Isotopenfraktionierung führt und die in früheren Studien *in vivo* gemessene Differenz zwischen Knochen und Serum *in vitro* bestätigt werden ( $\Delta = -0.27 \pm 0.03 \text{ ‰}$ ). Beim Abbau von Knochenmatrix durch Osteoklasten und bei Bindung von Calcium an Kollagen und Albumin trat keine Fraktionierung auf.

Auch die Tierversuche lieferten wichtige Erkenntnisse. So zeigte die mechanische Beanspruchung des Knochens keinen Einfluss auf die Ca-Isotopenratio. Weiterhin folgte die Isotopenverteilung innerhalb des Knochens der höchsten Knochenmineraldichte: diaphysär akkumulierte relativ mehr leichtes  $^{42}\text{Ca}$  als in der Meta- und Epiphyse. Diese Befunde waren unabhängig vom Ca-Gehalt der Nahrung. Auch ergaben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. 6 Wochen Ernährung mit Standard-Diät ging einher mit präferentiellem Einbau von leichterem  $^{42}\text{Ca}$  in den Knochen. Weiterhin war die Ca-Fraktionierung intestinal und renal tubulär umso ausgeprägter, je höher die jeweilige Ca-Absorptionsrate war.

Nutritive Ca-Restriktion führte bei den wachsenden Tieren zu signifikant weniger Ca-Aufnahme in 4 Wochen, trotz signifikant höherer relativer intestinaler Ca-Aufnahme. Auch die tubuläre Ca-Rückresorption war erhöht. Gleichzeitig konnte eine deutliche Abnahme von  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  in Kot und Urin und ein Anstieg der  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ -Ratio im Serum nachgewiesen werden. Es ergaben sich bei

diesen Tieren somit grundlegend andere Fraktionierungsvorgänge in Gastrointestinaltrakt und Niere, nämlich die vermehrte Aufnahme von schwerem  $^{44}\text{Ca}$  bei Ca-arm ernährten Tieren. Entsprechend korrelierte die Serum  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ -Ratio invers mit der Netto-Ca-Aufnahme pro Tag sowie invers mit den histologischen Parametern der Knochenmineralisierung zum Ende des Versuchs. Serum  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  korrelierte jedoch nicht mit dem Ca-Gehalt und nicht mit der Ca-Zunahme des Knochens.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit grundlegende Erkenntnisse über die der Ca-Isotopenfraktionierung zugrunde liegenden Prozesse in vitro und bei wachsenden Ratten mit normaler und Ca-reduzierter Diät erhoben, die für die Interpretation der Ca-Isotopenbefunde beim Menschen von Bedeutung sind. Insbesondere die Veränderung der intestinalen und renalen Ca-Fraktionierungsprozesse durch Ca-arme Diät und die fehlende bzw. bei Ca-Mangel inverse Korrelation mit den histologischen Parametern der Knochenmineralisation stellt bisherige Konzepte infrage und erfordert entsprechende klinische Studien.