

## Über den Einfluß der Niereninsuffizienz auf Knochenbildung und Knochenresorption

Eine tierexperimentelle Untersuchung zur Pathogenese der  
urämischen Osteopathie

B. Krempien, E. Ritz, K. Ditzten und G. Hudelmeier

Pathologisches Institut (Direktor: Prof. Dr. W. Doerr) und  
Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler) der Universität Heidelberg

Eingegangen am 10. Februar 1972

### Bone-Formation Rate and Bone-Resorption Rate in Renal Insufficiency

An Experimental Study on the Pathogenesis of Renal Osteopathy

*Summary.* Bone-formation rate and bone-resorption rate were measured with a tetracycline and alizarin red labelling technique in rats with acute renal insufficiency ( $\frac{5}{6}$ -nephrectomy). In short term experiments (72 h and 6 d) bone-formation rate is significantly reduced ( $-22\%$ ) in  $\frac{5}{6}$ -nephrectomized animals as compared with sham-operated, pair-fed controls. The reduction of the bone-formation rate was no longer significant in parathyroidectomized animals with renal insufficiency. The reduction is not caused by acidosis and elevation of serum urea ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ -acidosis and administration of urea in drinking water).

In spite of the hyperplasia of the parathyroid glands and the increase of osteoclasts in uremic rats the rate of bone resorption was somewhat decreased in 6 day experiments. This result suggests that bone resorption in renal insufficiency is reduced at the cellular level.

*Zusammenfassung.* An  $\frac{5}{6}$ -nephrektomierten Ratten mit akuter Niereninsuffizienz wurden Knochenbildung und Knochenresorption durch Tetracyclin- und Alizarin Rot-Markierung quantitativ bestimmt. Die Knochenbildung ist im Kurzzeitversuch (72 Std bzw. 6 Tage) bei  $\frac{5}{6}$ -nephrektomierten Ratten gegenüber scheinoperierten und paargefütterten Kontrolltieren hochsignifikant reduziert (22% bzw. 16,5%). Ein Rückgang der Knochenbildung kann unabhängig von einer Niereninsuffizienz durch exogen ausgelöste Acidose ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) oder Serum-Harnstofferhöhung (Harnstoff im Trinkwasser) nicht hervorgerufen werden. Es wird daraus geschlossen, daß metabolische Acidose und Azotämie auf die bei Ratten mit akuter Niereninsuffizienz nachgewiesene Reduktion der Knochenbildung keinen Einfluß haben. Eine geringe Reduktion der Knochenbildung um 6% nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie läßt sich bei parathyreoidektomierten Tieren statistisch nicht sichern. Da die Resorptionsrate bei  $\frac{5}{6}$ -nephrektomierten Ratten während einer Versuchsdauer von 6 Tagen trotz einer Hyperplasie der Nebenschilddrüsen mit Vermehrung der Osteoklasten nicht gesteigert ist, muß die celluläre Resorptionsleistung der Osteoklasten bei Ratten mit akuter Niereninsuffizienz gedrosselt sein.

Ostitis fibrosa und Osteomalacie, die das morphologische Bild der urämischen Osteopathie prägen (Ginzler u. Jaffe, 1941; Follis u. Jackson, 1943; Ammann, 1962; Garner u. Ball, 1966; Krempien et al., 1971), werden formal durch eine Änderung der Knochenbildung und des Knochenabbaues hervorgerufen. Beide Vorgänge lassen sich in weitere Teilvergänge aufgliedern; die Knochenbildung in Matrixsynthese und Mineralisation, der Knochenabbau in Entmineralisation

Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

und Matrixabbau. Quantitative Bestimmungen der An- und Abbauvorgänge im Skelet bei Urämie sind bislang nur von Jaworski et al. (1969), Sarnsethiri et al. (1969) und von Villanueva et al. (1970) durchgeführt worden. Die Frage, in welcher Weise die Teilvorgänge der Knochenbildung und des Knochenabbaues an der Pathogenese der urämischen Osteopathie beteiligt sind, ist bislang nicht näher geprüft worden. Wir haben deshalb versucht, sie in einer Reihe tierexperimenteller Untersuchungen quantitativ zu bestimmen (Krempien u. Ritz, 1970 a und b, 1971 a und b; Ritz et al., 1970, 1971 a und b; Krempien et al., 1972). Im folgenden soll über quantitative Bestimmungen der Knochenbildung und der Knochenresorption bei urämischen Ratten mit experimentell ausgelöster Niereninsuffizienz berichtet werden.

Quantitative Bestimmungen der Knochenbildung lassen sich durch Anwendung fluoreszierender Substanzen, die *intra vitam* in den neugebildeten Knochen eingebaut werden, mit großer Genauigkeit durchführen, wenn die markierenden Substanzen die Knochenbildung toxisch nicht beeinflussen und wenn sie nur durch Resorptionsvorgänge aus dem Knochen wieder herausgelöst werden. Tetracycline und Alizarin Rot erfüllen in niedriger Dosierung diese Anforderungen (Milch et al., 1957; Ghosez, 1959; Frost, 1963, 1969; Adkins, 1965; Gregor u. Clark, 1968; Kämmerer u. Eger, 1965; Saxen, 1965; Eger et al., 1967; Hong et al., 1968; Olerud u. Lorenzi, 1970).

Baylink et al. (1969, 1970) haben für die Bestimmung der Knochenbildung im Tierversuch ein sehr einfaches Modell angegeben. Durch die Injektion von Tetracyclin in Abständen von 8 Std konnten sie an der Tibiadiaphyse wachsender Ratten im Bereich der peri- und endostalen Appositionszonen breite, homogen markierte Säume erzeugen. Aus dem Nachweis verschiedenfarbig fluoreszierender Banden, die sie nach wechselnder Applikation von Tetracyclin und Alizarin Rot erhalten hatten, konnten sie sichern, daß der markierte neugebildete Knochen im Bereich der Tibiadiaphysenmitte während einer Versuchszeit von 10 Tagen voll erhalten bleibt, ohne durch Resorptionsvorgänge wieder reduziert zu werden. Da sie nachweisen konnten, daß außerhalb der end- und periostalen Appositionszonen im Bereich der Tibiadiaphyse keine weitere nennenswerte Knochenbildung stattfindet, darf der markierte Knochen für Versuchszeiten unter 10 Tagen mit der Knochenbildungsrate gleichgesetzt werden. Die folgenden Untersuchungen zur Knochenbildung bei urämischen Tieren führten wir mit Hilfe dieses Modells durch. Um den Einfluß einer unterschiedlichen Wachstumsintensität der Versuchstiere auf das Ergebnis zu eliminieren, wurden die Untersuchungen in einer zweiten Versuchsreihe mit Hilfe einer Tetracyclin-Alizarin-Doppelmarkierung am gleichen Tier vor und nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie durchgeführt. Durch gleichlaufende Untersuchungen an scheinoperierten Kontrolltieren sollte der Einfluß des Operationstraumas bestimmt werden. Durch Untersuchungen an parathyreoidektomierten Tieren und an Tieren mit einer exogen ausgelösten Acidose und Serum-Harnstoff erhöhung wollten wir prüfen, welchen Einfluß der sekundäre Hyperparathyreoidismus, die metabolische Acidose und die Azotämie unabhängig von einer bestehenden Niereninsuffizienz in dem von uns benutzten Versuchsmodell auf die Knochenbildung ausüben.

Die Nebenschilddrüsen sind im Tierexperiment bereits nach kurzdauernder Niereninsuffizienz vergrößert und aktiviert (Pappenheimer, 1936; Eger, 1937, 1940, 1942; Baker, 1960; Jastak et al., 1968). Beim Menschen ist der Serum-Parathormonspiegel schon bei geringer Einschränkung der Nierenfunktion gesteigert (Reiss u. Canterbury, 1969). Die Zahl der Osteoklasten ist bei der Ratte 6 Std nach Nephrektomie in der Femurmetaphyse erhöht (Toft u. Talmage, 1961). An einem Zusammenhang zwischen Niereninsuffizienz, Hyperplasie der Nebenschilddrüsen und einer Osteoklastenvermehrung besteht seit den Untersuchungen von Bodanski et al. (1930), Rutishauser (1932, 1936), Mach und Rutishauser (1937) und Eger (1942) kein Zweifel mehr. Die Frage, ob die Vermehrung der Osteoklasten mit einer entsprechenden Steigerung der Resorptionsrate ein-

hergeht, ist für tierexperimentelle Untersuchungen offen. Eine Änderung der Resorptionsrate durch eine experimentell ausgelöste Niereninsuffizienz suchten wir durch Bestimmung der Markraumgröße in der Tibiadiaphyse zu erfassen. Da die Markhöhle sich allein durch endostale Resorption zu vergrößern vermag, wird eine Änderung der Resorptionsrate an der Tibiadiaphyse in einer Änderung der Markraumgröße erkennbar werden müssen.

### Material und Methodik

*Allgemeines.* Die tierexperimentellen Untersuchungen führten wir am Modell der  $\frac{5}{6}$ -nephrektomierten Ratte durch. Als Versuchstiere dienten wachsende, 80—120 g schwere männliche Wistar-Ratten. Die  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie ( $\frac{5}{6}$ -NX) der Versuchstiere (U) wurde in einer Sitzung nach einer von Morrison (1966) angegebenen Methode in Äthernarkose ausgeführt: nach medianer Durchtrennung des Rückenfelles und paravertebraler Spaltung der Rückenmuskulatur wurden auf beiden Seiten die Nieren freigelegt und unter weitgehender Schonung der Nebennieren entkapselt. Die rechte Niere wurde nach Unterbindung des Ureters und der Hilusgefäße entfernt. Die linke Niere wurde durch Resektion des unteren und oberen Poles auf ein Drittel reduziert. Anschließend wurden Rückenmuskulatur und Rückenfell durch Einzelknopfnähte sorgfältig wieder verschlossen. Alle Kontrolltiere (Ko) wurden scheinoperiert (Flankenschnitt mit Freilegen und Entkapseln beider Nieren). Um eine Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch einen Hungereffekt zu vermeiden, wurden alle Tiere während der Versuche paargefüttert (Altromin®: 1370 mg Ca, 935 mg P, 100 IE Vitamin D/100 g; Fa. Altromin Lage. Tränkung mit Leitungswasser). Der Gewichtszuwachs der Tiere wurde täglich kontrolliert.

Gleiche Untersuchungen nahmen wir an parathyreoidektomierten Ratten ohne (PTX) und mit  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie (PTN) vor. Die Parathyreoidektomie führten wir in Äthernarkose mit einem Thermokauter nach Präparation der Schilddrüse durch. Den Operationserfolg bestimmten wir durch Kontrolle der Serum-Calciumspiegel aus dem Blut hungernder Tiere mittels Atomabsorptions-Spektrophotometrie (Perkin Elmer; Blutentnahme aus dem Plexus orbitalis). Die Tiere wurden auf Drahtrosten gehalten und hatten keine Gelegenheit, Spreu oder Faeces zu fressen. Nur Tiere mit einem sicheren Abfall des Serum-Calciumspiegels um mindestens 1,8 mg-% wurden zu weiteren Versuchen herangezogen (Serum-Calcium bei Kontrolltieren: 9,17 mg-%, nach Kauterisierung der Schilddrüse: 9,11 [1,11] mg-%; Versuchstiere nach Parathyreoidektomie: 5,2 [0,83] mg-%).

Intensität und Verlauf der durch  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie ausgelösten Niereninsuffizienz bestimmten wir durch fortlaufende Kontrolle der Serum-Harnstoffwerte (Blutentnahme aus dem Plexus orbitalis; enzymatische Methode, Fa. Boehringer, Mannheim): Serum-Harnstoffwerte 1 Tag nach  $\frac{5}{6}$ -NX: Ko 52,18 (4,2) mg-%, U 116,61 (20,9); 3 Tage nach  $\frac{5}{6}$ -NX: Ko 38,8 (8,4) mg-%, U 135,81 (27,6); 8 Tage nach  $\frac{5}{6}$ -NX: Ko 38,8 (5,4) mg-%, U 121,8 (24,2).

Die quantitativen Untersuchungen wurden an der rechten und linken Tibia der Tiere vorgenommen.

### Tierversuche

#### a) Quantitative Bestimmung der Knochenbildung und der Resorptionsrate an wachsenden Ratten mit akuter Niereninsuffizienz durch kontinuierliche Tetracyclinmarkierung

100 g schwere männliche Wistar-Ratten erhielten 24 Std nach  $\frac{5}{6}$ -NX oder Scheinoperation über einen Zeitraum von 6 Tagen Oxytetracyclin in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht in Intervallen von 8 Std i.p. appliziert. Am 6. Tag nach Markierungsbeginn, 8 Std nach der letzten Tetracyclininjektion, wurden alle Tiere in Äthernarkose getötet, ihre Tibien entfernt, von den Weichteilen befreit und in Methylmetacrylat eingebettet. Aus jeder Tibiadiaphyse wurden in Höhe der Tibia-Fibula-Verbindung mit einer Mikrosäge 3 aufeinanderfolgende Sägeschnitte abgetrennt und von Hand auf eine Stärke von 70  $\mu$  herabgeschliffen. Die Schliffstärke wurde mit einem Feintaster kontrolliert. Alle Schritte wurden in Durchlicht-

fluorescenz (Filter BG 12,5 mm; K 530) photographiert und die durch Tetracyclin markierten peri- und endostalen Säume in einer Endvergrößerung von 1:300 planimetrisch bestimmt. Alle Messungen wurden an 3 Schläifen der rechten und linken Tibia von je 7 Versuchstieren und von 7 Kontrolltieren vorgenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit der Meßergebnisse wurde durch teilhierarchische zweifache Varianzanalyse aus den Einzelwerten eines jeden Tieres errechnet.

Die Bestimmung der Resorptionsrate durch Messung der Markraumgröße ist nur dann möglich, wenn für einen bestimmten Untersuchungszeitraum auch die endostale Knochenapposition bekannt ist. Sie wurde durch die kontinuierliche Tetracyclinmarkierung über 6 Tage gemessen. Um die Knochenresorption voll zu erfassen, zogen wir die durch Tetracyclin markierte endostale Knochenfläche — als Ausdruck der im gleichen Zeitraum neu gebildeten Knochenfläche — in die Berechnung der Resorptionsrate mit ein. Die Resorptionsrate ergab sich danach wie folgt: Resorptionsrate im Bereich des Endostes = Markraumgröße zu Versuchsende + endostale Knochenapposition.

*b) Bestimmung der Knochenbildung an urämischen Ratten  
nach Parathyreoidektomie, unter den Bedingungen einer exogen ausgelösten  
Acidose und Azotämie durch Tetracyclin-Alizarin-Doppelmarkierung*

*Versuchsgruppe I.* 100 g schwere männliche Wistar-Ratten erhielten über einen Zeitraum von 72 Std in Intervallen von 8 Std Oxytetracyclin in Dosen von 5 mg/kg Körpergewicht i.p. injiziert. 72 Std nach Markierungsbeginn wurden die Tiere  $\frac{5}{6}$ -nephrektomiert oder scheinoperiert. Vom Ende der Operation an, 8 Std nach der letzten Tetracyclinenjektion, wurden alle Tiere über einen zweiten Zeitraum von 72 Std mit Alizarin Rot S in Dosen von 5 mg/kg Körpergewicht in Abständen von 8 Std markiert.

*Versuchsgruppe II.* 100 g schwere männliche Wistar-Ratten wurden 24 Std nach erfolgreicher Parathyreidektomie wie zuvor über 72 Std mit Tetracyclin, sodann nach  $\frac{5}{6}$ -NX oder Scheinoperation über weitere 72 Std mit Alizarin Rot S markiert.

*Versuchsgruppe III.* 80 g schwere männliche Wistar-Ratten erhielten in gleicher Versuchsanordnung nach einer Tetracyclinenmarkierung über 72 Std über einen zweiten Zeitraum von 72 Std peroral  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,75 M). Gleichzeitig wurden sie mit Alizarin Rot S markiert.

*Versuchsgruppe IV.* 80 g schwere männliche Wistar-Ratten erhielten nach einer Tetracyclinenmarkierung über 72 Std weitere 72 Std lang 3000 mg-% Harnstoff mit dem Trinkwasser zu saufen und wurden dabei wiederum mit Alizarin Rot S markiert. Die durch Harnstoffzugabe zum Trinkwasser erreichte Erhöhung der Serum-Harnstoffspiegel betrug 450 mg-%. Gleichschwere Tiere mit einer Tetracyclin-Alizarin-Doppel-Markierung ohne Gabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder Harnstoff dienten in den Versuchsgruppen III und IV als Kontrollen.

Alle Tiere wurden 144 Std nach Versuchsbeginn und 8 Std nach der letzten Alizarin-Injektion in Äthernarkose getötet. Ihre Tibien wurden entfernt und in Methylmetacrylat eingebettet. An 3 aufeinanderfolgenden Sägeschliffen aus der Mitte der rechten und linken Tibiadiaphyse wurden die durch Tetracyclin und Alizarin im UV-Licht kräftig gelb und rot fluoreszierenden, sich scharf gegeneinander abgrenzenden Säume mit Hilfe eines Ocularmikrometers an 8 fixen Punkten im Bereich der periostalen Appositionszenen gemessen. Die mittlere lineare Appositionsrate ergab sich aus der Summe der Einzelwerte beider Tibien eines jeden Tieres. Die statistische Prüfung der Ergebnisse erfolgte durch Varianzanalyse (hierarchisches Modell mit 2 Faktoren und 3 Klassen) aus den an 3 Schläifen der linken Tibiadiaphyse erhobenen Einzelmeßwerten von je 7 Versuchs- und 7 Kontrolltieren.

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 als Mittelwerte mit Standardabweichungen zusammengefaßt.

### Ergebnisse

*a) Quantitative Bestimmung der Knochenbildung und der Resorptionsrate*

Das Ergebnis der quantitativen Auswertung ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Das Körpergewicht der Versuchs- und Kontrolltiere unterscheidet sich nach Paar-fütterung am Versuchsende nicht. Die durch Tetracyclin markierte Knochenfläche

der Kontrolltiere ist um 14 % größer als die der urämischen Versuchstiere. Setzt man die markierte Knochenfläche in Relation zur Tibiagesamtschnittfläche, um geringe Größenunterschiede zwischen den Tibien auszugleichen, dann wird der Unterschied mit 16,5% zwischen Kontrolltieren und urämischen Versuchstieren noch deutlicher. Er ist mit  $p < 0,05$  signifikant. Die Abb. 1a und b zeigen den Befund. Die Markraumgröße urämischer Versuchstiere und scheinoperierter Kontrolltiere lässt nach einer Versuchsdauer von 6 Tagen keinen Unterschied erkennen.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Meßergebnisse nach einer über 6 Tage durchgeführten kontinuierlichen Tetracyclinmarkierung bei wachsenden Ratten mit und ohne  $^{5/6}$ -Nephrektomie (Mittelwerte mit Standardabweichungen)

	Ko	$^{5/6}$ -NX	% - Änderung <sup>a</sup>	Signifikanz <sup>b</sup>
Tierzahl	7	7	—	—
Tierge wicht (in g)	119 (6)	120 (5)	—	—
Markierte Knochenfläche (in mm <sup>2</sup> )	0,352 (0,064)	0,268 (0,041)	14,0 %	$p < 0,05$
Markierte Knochenfläche (in mm <sup>2</sup> / Knochenfläche in mm <sup>2</sup> )	0,114 (0,044)	0,084 (0,023)	16,5 %	$p < 0,05$
Markraum (+ markierte endostale Knochenfläche) in mm <sup>2</sup> / Tibiagesamtschnittfläche in mm <sup>2</sup>	0,293 (0,039)	0,289 (0,044)	—	—

<sup>a</sup> Kontrolltiere gegen Versuchstiere.

<sup>b</sup> Irrtumswahrscheinlichkeit errechnet durch teilhierarchische zweifache Varianzanalyse.

*b) Quantitative Bestimmung der Knochenbildung bei urämischen Ratten mit und ohne Parathyreoidektomie, nach exogener Acidose und exogener Serum-Harnstofferhöhung*

Die mittlere Breite der mit Alizarin Rot S nach  $^{5/6}$ -NX markierten Säume ist um 22 % geringer als die mittlere Saubreite der vor  $^{5/6}$ -NX an gleichen Tieren während eines gleich langen Versuchszeitraumes erzeugten Tetracyclinmarkierung (Abb. 2). Zwischen der mittleren Saubreite der an scheinoperierten Kontrolltieren gemessenen mittleren Tetracyclin- und Alizarinmarkierung ist ein Unterschied im Gegensatz dazu nicht erkennbar (Tabelle 2). Die Signifikanz der in der Urämie gemessenen Reduktion ist mit  $p < 0,01$  gegeben: Ko vor Scheinoperation 16,7 (2,9)  $\mu$ , nach Scheinoperation 16,5 (3,1)  $\mu$ ; U vor  $^{5/6}$ -NX 16,8 (2,3)  $\mu$ , nach  $^{5/6}$ -NX 13,1 (1,4)  $\mu$ .

Bei den parathyreoidektomierten Tieren ist die Saubreite gegenüber den Kontrolltieren der Versuchsgruppe I ohne Parathyreoidektomie deutlich reduziert: mittlere Saubreite Ko 16,7 (2,9)  $\mu$ , PTX 12,8 (2,7)  $\mu = 23,5\%$ . Bei den parathyreoidektomierten Tieren kommt es nach zusätzlicher  $^{5/6}$ -NX (PTN) zu einem weiteren geringgradigen Rückgang der mittleren Saubreite um 6 %, der bei den parathyreoidektomierten Kontrolltieren (PTX) nicht auftritt. Dieser Rückgang lässt sich statistisch aber nicht sichern: PTX vor Scheinoperation 12,8 (2,7)  $\mu$ ,

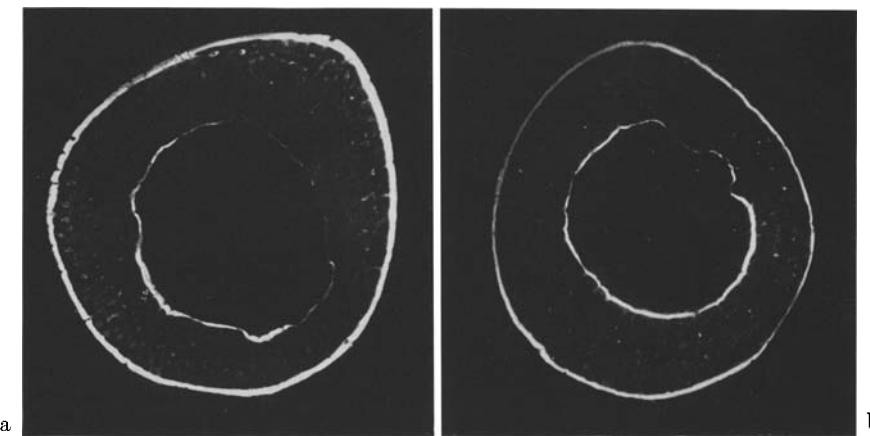


Abb. 1a u. b. Querschnitte durch die Tibiadiaphyse. a Kontrolltier mit breiter peri- und endostaler tetracyclinmarkierter Apposition. b Versuchstier 7 Tage nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie. Deutlich geringere end- und periostale Knochenapposition. 50  $\mu$  starker Knochenschliff. Durchlichtfluorescenz. Vergr. 1:10

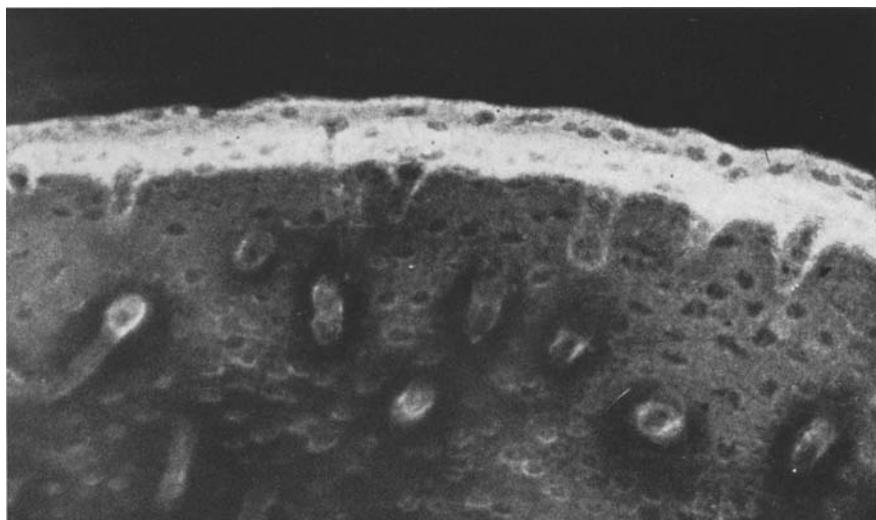


Abb. 2. Periostale Appositionszone aus einem Querschnitt durch die Tibiadiaphyse mit Tetracyclin- (innen) und Alizarin Rot- (außen) Doppelmarkierung. Merkliche Reduktion der nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie während 72 Std erzeugten Alizarin-Markierung gegenüber einer während 72 Std vor  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie erzeugten Tetracyclinmarkierung. Knochendünnschliff 50  $\mu$ . Durchlichtfluorescenz. Vergr. 1:100

nach Scheinoperation 12,5 (1,5)  $\mu$ ; PTN vor  $\frac{5}{6}$ -NX 13,1 (2,8)  $\mu$ , nach  $\frac{5}{6}$ -NX 12,3 (2,8)  $\mu$ ,  $p = 0,1$ .

Unter einer exogen durch perorale Gabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ausgelösten Acidose und einer durch Harnstoffzugabe zum Trinkwasser herbeigeführten Harnstofferhöhung

Tabelle 2. Bestimmung der linearen Knochenapposition an der Tibiadiaphyse wachsender Ratten durch Tetracyclin-Alizarin-Doppelmarkierung (mittlere Saumbreite mit Standardabweichungen)

Versuchsgruppe		Tierzahl	Tetracyclin, mittlere Saumbreite	Alizarin, mittlere Saumbreite	Signifikanz %-Änderung
I	Ko	7	16,7 (2,9) $\mu$	16,5 (3,1) $\mu$	—
	U	7	16,8 (2,8) $\mu$	13,1 (1,4) $\mu$	$p < 0,01$ — 22 %
II	PTX	7	12,8 (2,7) $\mu$	12,5 (1,5) $\mu$	—
	PTN	7	13,1 (2,8) $\mu$	12,3 (2,8) $\mu$	$p = 0,1$ — 6 %
III	Ko	14	24,9 (4,0) $\mu$	25,8 (4,9) $\mu$	—
	Acidose	14	24,4 (4,4) $\mu$	25,2 (4,9) $\mu$	—
IV	Harnstoff	14	24,5 (4,4) $\mu$	25,0 (4,5) $\mu$	—

im Serum kommt es zu keiner Änderung der mittleren Saumbreiten (Tabelle 2). Die allgemein größere Saumbreite der Versuchsgruppen III und IV gegenüber den Gruppen I und II erklärt sich durch das geringere Lebensalter der nur 80 g schweren Tiere in Gruppe III und IV mit einer größeren Wachstumsintensität.

### Diskussion der Ergebnisse

Die quantitativen Untersuchungen zur Knochenbildung und zur Resorption unter den Bedingungen einer experimentell ausgelösten Niereninsuffizienz haben wir mit den fluoreszierenden Farbstoffen Tetracyclin und Alizarin Rot S durchgeführt. Beide Farbstoffe werden in die Appositionszonen des Knochens eingebaut (Ghosez, 1959; Gregor u. Clark, 1965). Da sie erst durch eine Destruktion des markierten Knochens wieder herausgelöst werden, sind sie für morphologische Untersuchungen von Wachstums- und Umbauvorgängen im Knochen gut geeignet. Die Halbwertszeit von Oxytetracyclin beträgt im Organismus nach Untersuchungen von Merier et al. (1970) 9,3 Std. Durch die Applikation des Farbstoffes in kurzen Intervallen (8 Std) läßt sich deshalb eine kontinuierliche Markierung des neugebildeten Knochengewebes erreichen. Die planimetrische Bestimmung der markierten Knochenflächen oder die Messung der mit Tetracyclin oder Alizarin markierten Saumbreiten gibt die Knochenbildung/Zeit an. Da die in unseren Versuchen verwandten Substanzen in höherer Dosierung toxisch wirken und die Knochenbildung hemmen (Hong et al., 1968), wurde eine niedrige Dosierung von uns eingehalten. Dies ist vor allem bei Untersuchungen an urämischen Tieren wichtig, weil die Halbwertszeit des Oxytetracyclins von der Größe des Glomerulumfiltrates abhängig ist und bei Oligo-Anurie von normal 9,3 Std auf etwa 66 Std verlängert sein kann (Merrier et al., 1970). Durch die  $^{5/6}$ -Nephrektomie steigt der Serum-Harnstoffspiegel auf durchschnittlich 110 mg-% an. Die Serum-Kreatinin-Spiegel sind mit 2 mg-% kaum erhöht (Schaefer et al., 1971), so daß eine stärker-

gradige Reduktion des Glomerulumfiltrates für das von uns benutzte Versuchsmodell ausgeschlossen werden kann.

Die quantitative Bestimmung der Knochenbildung bei wachsenden Ratten läßt erkennen, daß unter den Bedingungen der experimentell durch  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie ausgelösten Niereninsuffizienz die Knochenbildung deutlich zurückgeht (Tabelle 1 und 2, Abb. 1a und b, Abb. 2). Ein einfacher Hungereffekt oder das mit der  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie zweifellos verbundene Operationstrauma lassen sich als Ursache der reduzierten Knochenbildung ausschließen, da alle Tiere während der Versuche streng paargetüftert, die Kontrolltiere zudem einer ausgedehnten Scheinoperation unterworfen waren. Die Effizienz der Paarfütterung wurde durch tägliche Bestimmung der Tiergewichte kontrolliert. Da die mittlere Saumbreite der Kontrolltiere vor und nach Scheinoperation gleich ist (Tabelle 2), kann der Einfluß des Operationstraumas auf die Saumbreite für gering erachtet und die Reduktion der Knochenbildung als die Folge der Niereninsuffizienz angesehen werden.

Eine Reduktion der Knochenbildung kann rein formal durch eine Reihe verschiedenartiger Störungen hervorgerufen werden: sie könnte die Folge einer reduzierten Matrixbildung sein, die einen Rückgang der Mineralisationsrate einfach nach sich zieht. Eine Mineralisationsstörung könnte auch unabhängig von einer Alteration der Matrixsynthese auftreten. Schließlich wäre es denkbar, daß in der Urämie eine qualitative Änderung der Matrix eine Mineralisation verhindert. Der genaue Ort der Tetracyclinbindung im Knochen ist unbekannt (Gregor u. Clark, 1965). Folgt man der Vorstellung, nach der die Tetracycline eine Chelatbindung mit Ca-Ionen eingehen (Häkkinen u. Lindgren, 1963), dann wird man den Befund einer reduzierten Tetracyclinmarkierung des neugebildeten Knochengewebes in der Urämie als Ausdruck einer Mineralisationsstörung verstehen dürfen. Münzenberg (1970), Münzenberg und Rössler (1970) haben kürzlich die Vorstellung vertreten, eine Tetracyclinmarkierung des Knochens zeige lediglich ein mineralisationsfähiges Kollagen, nicht aber seine Mineralisation an. Gregor und Clark (1965) konnten nachweisen, daß Tetracycline zu einer Zeit in die Appositionszonen des Knochens eingelagert werden, zu der die Osteoblasten organische Matrix synthetisieren. Sie konnten aus den Röhrenknochen von Kaninchen eine fluoreszierende Eiweißfraktion isolieren, die nicht aus Kollagen oder Mucopolysacchariden besteht. Die Reduktion der Tetracyclinmarkierung bei urämischen Tieren könnte somit durchaus auch Ausdruck einer gestörten Matrixbildung sein.

In eigenen experimentellen Untersuchungen zur Matrixsynthese bei urämischen Ratten haben wir im Skelet eine Reduktion der Kollagensynthese und der Synthese saurer Mucopolysaccharide nachweisen können (Krempien u. Ritz, 1970, 1971a und b; Krempien et al., 1972; Ritz et al., in Vorbereitung). Die Reduktion der Knochenbildung bei urämischen Ratten fände durch diesen Befund durchaus ihre Erklärung. Eine Mineralisation von neugebildeter Knochenmatrix tritt erst nach Ablauf einer „Osteoidreifungszeit“ ein. Sie beträgt bei der Ratte 10 Tage (Baylink et al., 1970). Die dabei ablaufenden Prozesse sind bislang nicht näher bekannt, doch spielt der Abbau der sauren Mucopolysaccharide, der nach Untersuchungen von Dulce (1960a und b) und Eger (1963) neben der Phosphatanreicherung als lokaler Faktor der Verkalkung gelten kann, dabei eine zentrale Rolle. Der Abbau der sauren Mucopolysaccharide ist bei urämischen Ratten deut-

lich verzögert (Krempien u. Ritz, 1971; Krempien, 1972). Seine mögliche Bedeutung für die Pathogenese der urämischen Osteopathie, in Sonderheit der Osteomalacie liegt nahe und ist das Ziel weiterer Untersuchungen.

Die urämische Osteomalacie ist morphologischer Ausdruck eines *Mineralisationsblockes*, durch den die Verkalkung der neugebildeten Knochenmatrix unterbleibt. Ihre Ursache ist — neben einer möglichen Störung des Mucopolysaccharid-Stoffwechsels — vor allem in einer Störung der biologischen Vitamin D-Wirkung in der Urämie (urämische Vitamin D-Resistenz) zu suchen. Zu den frühesten Störungen, die nach Beginn einer Niereninsuffizienz bislang nachgewiesen werden konnten, gehört eine Störung der intestinalen Calciumresorption. Eine Calciummalabsorption läßt sich im Tierexperiment an der Ratte schon 6 Std nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie nachweisen (Ritz, 1971; Spannagel et al., 1971). Die enterale Calciumresorption ist an eine Reihe Vitamin D-abhängiger Vorgänge gebunden: Wasserman und Taylor (1966, 1968, 1969) haben in der Dünndarmmucosa die Bildung eines Calcium-bindenden Proteines nachgewiesen. Seine Synthese ist bei urämischen Ratten 6 Std nach Nephrektomie signifikant reduziert (Ritz, 1971). Die für die enterale Calciumresorption wichtige Adenosintriphosphatase, die von Martin et al. (1969) im Bürstensaum der Dünndarmepithelien gefunden wurde, und das cyclische Adenosin-Monophosphat sind von einem Vitamin D-induzierten Faktor abhängig (Harrison u. Harrison, 1970). Die urämische Vitamin D-Resistenz, deren Pathogenese im einzelnen noch offen ist (Schaefer et al., 1971 a und b), kann über diese Faktoren die intestinale Calciumresorption beeinflußen. Die urämische Vitamin D-Resistenz läßt sich im Tierexperiment auch am Knochen nachweisen. Sie ist dort unabhängig von der intestinalen Calciummalabsorption. Die Mineralisation des Skeletes ist ein cellulärer Vorgang, der durch Vitamin D direkt beeinflußt wird (Fourman u. Royer, 1968). Es ist deshalb durchaus möglich, daß in der Urämie am Knochen frühzeitig eine ähnliche Störung im Calciumtransport wie am Darm auftritt. Die Frage, welche Störung der Knochenbildung (Reduktion der Matrixbildung, Störung der Mineralisation oder Umsatzstörung der Mucopolysaccharide mit nachfolgender Hemmung der Mineralisation) den im vorliegenden Tierversuch erhobenen Befund einer reduzierten Knochenbildung urämischer Ratten erklärt, muß vorerst offen bleiben.

Bei den parathyreoidektomierten Tieren führt die Urämie zu einem geringgradigen Rückgang der Knochenbildung um 6%, der sich statistisch aber nicht sichern läßt (Tabelle 2). Dieser Befund kann dafür sprechen, daß der Rückgang der Knochenbildung in der Urämie an die Funktion der Nebenschilddrüsen gebunden ist und vielleicht die Folge eines sekundären Hyperparathyreoidismus darstellt. Die Nebenschilddrüsen sind im Tierexperiment schon nach kurzdauerner Niereninsuffizienz aktiviert (Pappenheimer, 1936; Eger, 1942; Baker, 1960; Jastak et al., 1968). Untersuchungen von Jaworski et al. (1969), Sarnsethiri et al. (1969) und Villanueva et al. (1970) mit Tetracyclinmarkierungen an den Rippen urämischer Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus und von Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus scheinen einen Zusammenhang zwischen der Überfunktion der Nebenschilddrüsen und der Reduktion der Knochenbildung zu bestätigen, da die Knochenbildung bei allen Patienten reduziert war.

Die metabolische Acidose wurde immer wieder als Ursache der urämischen Osteopathie diskutiert (Ginzler u. Jaffe, 1941; Ammann, 1962; Leman, 1969;

Lennon, 1969). Die bei Niereninsuffizienz retinierten Säureäquivalente werden vermutlich durch das Skeletcalcium abgepuffert (Litzow et al., 1967). Experimentelle Untersuchungen von Barzel (1970), Barzel und Jowsey (1970) sprechen gegen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Acidose und urämischer Osteopathie, da es durch chronische  $H_4Cl$ -Acidose beim Versuchstier nicht gelingt, eine der urämischen Osteopathie gleichende Skeletterkrankung zu erzeugen. Experimentelle Untersuchungen zur Matrixsynthese bei Acidose haben keine Reduktion ergeben (Ritz et al., 1971). Während der Harnstofferhöhung im Serum bei Urämie bislang nur für die Pathogenese der urämischen Gastropathie eine Bedeutung zuzukommen scheint (Mason, 1952; Krempien et al., 1971a und b, Ritz et al., 1971), sind die Veränderungen anderer Organsysteme in der Urämie mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Höhe des Serum-Harnstoffspiegels (Tescham, 1970). Die vorliegenden Meßergebnisse (Tabelle 2) zeigen, daß weder die Acidose noch der Harnstofferhöhung für die Reduktion der Knochenbildung bei urämischen Ratten eine nennenswerte Bedeutung zukommen kann, da die mittlere Saumbreite der linearen Knochenapposition unter der Einwirkung einer exogen ausgelösten Acidose oder einer exogenen Azotämie nicht reduziert ist.

Da die Knochenbildung bei urämischen Ratten gedrosselt ist, stellt sich die Frage nach dem Verhalten der Resorptionsrate. Die Bilanz zwischen Knochenbildung und Knochenabbau ist im Skelet auch bei Zuständen einer veränderten Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität im allgemeinen ausgeglichen (Vittalli, 1970). In der experimentell durch eine Reduktion des Nierenparenchyms ausgelösten Niereninsuffizienz steigt die Zahl der Osteoklasten im Skelet rasch an. Toft und Talmage (1960) konnten schon 6 Std nach Nephrektomie in der Femurmetaphyse von Ratten eine Zunahme der Osteoklasten nachweisen. Wir selbst haben diesen Befund kontrolliert und bestätigen können (Krempien, 1972). Die Osteoklastenvermehrung blieb in unseren Versuchen von 12 Std bis zu 28 Tagen nach  $\frac{5}{6}$ -Nephrektomie ziemlich konstant. Auch der Grad der Niereninsuffizienz, erkennbar an der Höhe der Serum-Harnstoffspiegel ändert sich während dieser Zeit nicht. Die Resorptionsrate haben wir aus der Vergrößerung der Markhöhle in der Tibiadiaphyse bestimmt. Die Markraumgröße unterscheidet sich bei urämischen Ratten 6 Tage nach Versuchsbeginn nicht von der scheinoperierter Kontrolltiere (Tabelle 1). Die Resorptionsrate der Versuchstiere hat offenkundig durch die Niereninsuffizienz keine Steigerung erfahren. Da die endostale Knochenapposition, die bei urämischen Tieren verringert ist, in die Berechnung der Markraumgröße einbezogen wird, dürfte die Resorptionsrate urämischer Tiere sogar etwas hinter der der Kontrolltiere zurückbleiben. Aus der Osteoklastenvermehrung und einer normalen oder leicht reduzierten Resorptionsrate läßt sich eine Verminderung der cellulären Resorptionsleistung der Osteoklasten ableiten. Die Möglichkeit, daß sich in der gedrosselten Resorptionsleistung der Osteoklasten die in der Urämie auftretende Parathormonresistenz ausdrückt, scheint nahezu liegen. Da Jaworski et al. (1969) und Villanueva et al. (1970) eine Reduktion der cellulären Resorptionsleistung jedoch auch bei primärem Hyperparathyreoidismus gefunden haben, läßt sich diese Möglichkeit nicht vertreten.

Zusammenfassend haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß die akute Niereninsuffizienz im Tierexperiment schon nach wenigen Stunden bei Ratten mit funktionstüchtigen Nebenschilddrüsen zu einer morphologisch erfaßbaren Reduk-

tion der Knochenbildung führt. Dieser Rückgang kann unabhängig von einer Niereninsuffizienz durch exogen ausgelöste Acidose oder Serum-Harnstofferhöhung allein nicht hervorgerufen werden. Die Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, daß die Resorptionsrate bei Ratten mit 5/6-Nephrektomie trotz einer Hyperplasie der Nebenschilddrüsen und einer Osteoklastenvermehrung leicht zurückgeht, und daß die Bilanz zwischen Knochenbildung und Knochenresorption bei Versuchstieren mit akuter Niereninsuffizienz unter den Bedingungen eines Kurzezeitexperimentes ausgeglichen ist.

### Literatur

- Adkins, K. F.: Alizarin red S as an intravital fluorochrome in mineralizing tissues. *Stain Technol.* **40**, 69—70 (1965).
- Amman, C.: Renale Fibroosteoclasie und Osteomalacie bei interstitieller Nephritis. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 46—62 (1962).
- Baker, B. L.: The structural response of the parathyroid gland to ureteral ligation or bilateral nephrectomy. *Anat. Rec.* **93**, 125—132 (1960).
- Barzel, U.: The effect of excessive acid feeding on bone. *Calc. Tiss. Res.* **4**, 94—100 (1970).
- Barzel, U., Jowsey, J.: The effects of chronic acid and alkali administration on bone turnover in adult rats. *Clin. Sci.* **36**, 517—524 (1970).
- Baylink, D., Morey, E., Rich, C.: Effect of calcitonin on the rates of bone formation and resorption in the rat. *Endocrinology* **84**, 261—272 (1969).
- Baylink, D., Stauffer, M., Wergedal, J., Rich, C.: Formation, mineralization, and resorption of bone in vitamin D-deficient rats. *J. clin. Invest.* **49**, 1122—1134 (1970).
- Bodansky, A., Blair, J. E., Jaffe, H. L.: Experimental hyperparathyroidism in guinea pigs leading to ostitis fibrosa. *J. biol. Chem.* **88**, 629—647 (1930).
- Dulce, H. J.: Mineralgehalt und Grundsubstanzzusammensetzung des hyalinen Knorpels, des verknöchernden Knorpels und des Knochens. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **319**, 257—271 (1960).
- Dulce, H. J.: Mineralgehalt, Grundsubstanzzusammenstellung und Enzymaktivitäten im Callusgewebe und in rachitischen Knochen von Ratten. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **320**, 1—15 (1960).
- Eger, W.: Über Ostitis fibrosa und Epithelkörperchen im Tierexperiment. *Beitr. path. Anat.* **100**, 19—41 (1937).
- Eger, W.: Weitere Untersuchungen zur experimentellen Ostitis fibrosa. *Virchows Arch. path. Anat.* **306**, 183—192 (1940).
- Eger, W.: Osteodystrophia fibrosa generalisata, Epithelkörperchen und Nieren. *Frankfurt Z. Path.* **56**, 370—450 (1942).
- Eger, W.: Kalziumnachweis und Mineralisation des Knochengewebes. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **47**, 54—69 (1963).
- Eger, W., Kämmerer, H., Trapp, L.: Simultane fluoreszenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchungen an unentkalkten Dünnschliffen von Knochengewebe. *Zeiss-Inform.* **15**, 64—68 (1967).
- Follis, R. H., Jackson, D. A.: Renal osteomalacia and osteitis fibrosa in adults. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **72**, 232—240 (1943).
- Fourman, P., Royer, P.: Calcium metabolism and the bone. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1968.
- Frost, H. M.: Bone remodelling dynamics. Springfield (Ill.): Charles C. Thomas 1963.
- Frost, H. M.: Tetracycline-based histological analysis of bone remodelling. *Calc. Tiss. Res.* **3**, 211—237 (1969).
- Garner, A., Ball, J.: Quantitative observations on mineralised and unmineralised bone in chronic renal azotemia and intestinal malabsorption syndrome. *J. Path. Bact.* **91**, 545—561 (1966).
- Ghosez, J. P.: La microscopie de fluorescence dans l'étude du remaniement haversien. *Arch. Biol. (Liège)* **70**, 169—176 (1959).

- Ginzler, A. M., Jaffe, H. L.: Osseous findings in chronic renal insufficiency in adults. Amer. J. Path. **17**, 293—302 (1941).
- Gregor, J. G., Clark, J.: Studies on the binding of tetracycline to mineralized tissue. Fed. Proc. **24**, 543 (1965).
- Häkkinen, I. P. T., Lindgren, I.: The localization of tetracycline in the metastatic calcifications in the stomach of rat induced by overdosage of dihydrotachysterol and vitamin D<sub>3</sub>. Acta path. microbiol. scand. **59**, 428 (1963).
- Harrison, H. C., Harrison, H. E.: Dibutyryl cyclic AMP, vitamin D and intestinal permeability to calcium. Endocrinology **86**, 756—760 (1970).
- Hong, Y. C., Yen, P. K. J., Shaw, J. H.: Microscopic evaluation of the effects of some vital staining agents on growing bone in rabbits. Calc. Tiss. Res. **2**, 286—295 (1968).
- Jastak, J. Th., Morrison, A. B., Raisz, L. G.: Effects of renal insufficiency on the parathyroid gland and calcium homeostasis. Amer. J. Physiol. **215**, 84—89 (1968).
- Jaworski, Z. F., Villanueva, A. R., Hitt, O., Sarnsethiri, P., Frost, H. M.: Tetracycline-based study of bone remodelling in patients on maintenance dialysis. IV. Intern. Congr. Nephrol., Stockholm, Sweden, 1969, p. 24.
- Kämmerer, H., Eger, W.: Tetracycline und Knochenstoffwechsel. Med. Welt **1965**, 986—991.
- Krempien, B.: Morphologische Untersuchungen zur Pathogenese der Skelettveränderungen bei Urämie. Habil.-Schr. 1972.
- Krempien, B., Ritz, E.: Experimentelle mikromorphometrische Untersuchungen zur urämischen Osteodystrophie. Verh. dtsch. Ges. Path. **54**, 397—402 (1970).
- Krempien, B., Ritz, E.: Experimentelle Untersuchungen zur Mineralisation und zur Matrixbildung bei urämischer Osteopathie. VII. Symp. Ges. Nephrol. 1970, 281—286 Stuttgart-New York: Schattauer 1971.
- Krempien, B., Ritz, E.: Experimental renal osteopathy. Israel J. med. Sci. **7**, 522—524 (1971).
- Krempien, B., Ritz, E., Heuck, F.: Osteopathie bei Urämie. Histologische, mikroradiographische und mikromorphometrische Untersuchungen. Verh. dtsch. Ges. Path. **55** (1971).
- Krempien, B., Ritz, E., Schmidt, G.: Experimentelle autoradiographische Untersuchungen zum Kollagenstoffwechsel des Knochens in der Urämie. Z. Orthop. **110**, 25—34 (1972).
- Krempien, B., Wanke, M., Ritz, E.: Histochemische Untersuchungen zur Bildung der Mucosubstanzen in der Magenschleimhaut bei Urämie. XV. Symposium Ges. Histochem., Düsseldorf 1971.
- Krempien, B., Ritz, B., Wanke, M., Wegener, K.: Uremic gastropathy. Intern. Conf. on Uremia. Freiburg 1971, im Druck.
- Leman, J.: Acidosis and calcium metabolism in chronic azotemic renal disease. Proc. 4. Intern. Congr. Nephrol. Stockholm 1969, vol. 2, p. 153.
- Lennon, E. J.: Metabolic acidosis. A factor in the pathogenesis of azotemic osteodystrophy? Arch. intern. Med. **124**, 557—561 (1969).
- Litzow, J. R., Leman, J., Lennon, E. J.: The effect of treatment of acidosis on calcium balance in patients with chronic renal disease. J. clin. Invest. **46**, 280—286 (1967).
- Mach, R. S., Rutishauser, E.: Les ostéodystrophies rénales. Etude expérimentale et anatomo-clinique des lésions osseuses au cours de néphrites. Helv. med. Acta **4**, 423 (1937).
- Martin, D. L., Melancon, M. J., De Luca, H. F.: Vitamin D stimulated, calcium dependent adenosine triphosphatase from brush borders of rat small intestine. Biochem. biophys. Res. Commun. **35**, 819—823 (1969).
- Mason, E. E.: Gastrointestinal lesions occurring in uremia. Ann. intern. Med. **37**, 96—105 (1952).
- Merier, G., Rudhardt, M., Herrera, A., Wasem, R., Fabre, J.: Le compartement de l'oxytétracycline en cas d'insuffisance rénale. Schweiz. med. Wschr. **100**, 1442—1448 (1970).
- Milch, R. A., Rall, D. P., Tobie, J. E.: Bone localization of the tetracyclines. J. nat. Cancer Inst. **19**, 87 (1957).
- Morrison, A. B.: Experimental chronic renal insufficiency. Meth. Achiev. exp. Path. **1**, 455—475 (1966).
- Münzenberg, K. J.: Untersuchungen zur Kristallographie des Knochenminerals. Biomineralsation **1**, 69—100 (1970).

- Münzenberg, K. J., Rössler, H.: Bedeutung der Knochenminerale für die Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Knochens. Dtsch. med. Wschr. **95**, 1693—1697 (1970).
- Olerud, S., Lorenzi, G. L.: Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption. J. Bone Jt Surg. **52-A**, 274 (1970).
- Pappenheimer, A. M.: The effect of experimental reduction of kidney substance upon the parathyroid glands and the skeletal tissue. J. exp. Med. **64**, 965—976 (1936).
- Reiss, E., Canterbury, J. M.: Parathyroid hormone in renal insufficiency. Proc. 4. Intern. Congr. Nephrol., Stockholm 1969, vol. 2, p. 164.
- Ritz, E., Andrassy, K.: Intestinal calcium transport in experimental uremia. Israel J. med. Sci. **7**, 391—392 (1971).
- Ritz, E., Andrassy, K., Krempien, B.: Osteocytentstoffwechsel bei experimenteller Urämie. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **76**, 703—706 (1970).
- Ritz, E., Andrassy, K., Krempien, B., Keller, U.: Knochenstoffwechsel bei metabolischer Acidose. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. **77** (1971).
- Ritz, E., Krempien, B., Fouquet, R.: Untersuchungen zum Stoffwechsel der sauren Mucopolysaccharide des Skelettes bei experimenteller Niereninsuffizienz. In Vorber.
- Ritz, E., Krempien, B., Kütemeyer, H., Andrassy, K.: Osteopathy in experimental uremia. Vitamin D-resistance. Klin. Wschr. **49**, 113—115 (1971).
- Rutishauser, E.: Über experimentelle Erzeugung von Ostitis fibrosa. Zbl. allg. Path. path. Anat. **53**, 305—310 (1932).
- Rutishauser, E.: Ostéodystrophie néphrogène. Ann. Anat. path. **13**, 999 (1936).
- Sarnsethiri, P., Jaworski, Z. F., Shimizu, A. G., Frost, H. M.: New bone formation, osteoid seam thickness and appositional rate in patients undergoing renal dialysis. Arch. Path. **88**, 49—53 (1969).
- Saxen, L.: Tetracycline: effect on osteogenesis in vitro. Science **149**, 870 (1965).
- Schaefer, K., Opitz, A.: Pers. Mitteilung.
- Schaefer, K., Opitz, A., Herrath, D. v., Koch, H. U., Stratz, R.: Metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in nephrectomized rats. Klin. Wschr. **49**, 709—712 (1971).
- Schaefer, K., Opitz, A., Herrath, D. von, Stratz, R., Koch, H. U.: Der Stoffwechsel von 25-Hydroxycholecalciferol bei gesunden und nephrektomierten Patienten. Dtsch. med. Wschr. **96**, 798—803 (1971).
- Spannagel, B., Ritz, E., Andrassy, K.: Intestinaler Kalziumtransport bei Urämie. Fortschritte Nephrologie. VIII. Symp. Ges. Nephrol. 1970. Stuttgart-New York: Schattauer 1971.
- Taylor, A. N., Wasserman, R. H.: Correlations between the vitamin D-induced calcium binding protein and intestinal absorption of calcium. Fed. Proc. **28**, 1834—1838 (1969).
- Teschan, P. E.: On the pathogenesis of uremia. Amer. J. Med. **48**, 671—677 (1970).
- Toft, R. J., Talmage, R. V.: Quantitative relationship of osteoclasts to parathyroid function. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **103**, 611—613 (1960).
- Villanueva, A. R., Jaworski, Z. F., Hitt, O., Sarnsethiri, P., Frost, H. M.: Cellular-level bone resorption in chronic renal failure and primary hyperparathyroidism. A tetracycline-based evaluation. Calc. Tiss. Res. **5**, 288—304 (1970).
- Vittali, P. H.: Knochenerkrankungen. Histologie und Klinik. Sandoz Monographien, 1970.
- Wasserman, R. H., Taylor, A. N.: Vitamin D-dependent calcium-binding protein. J. biol. Chem. **243**, 3987—3993 (1968).

Priv.-Doz. Dr. med. B. Krempien  
Pathologisches Institut der Universität  
D-6900 Heidelberg  
Berliner Straße 5  
Deutschland