

5. ZUSAMMENFASSUNG

Neben den für das Vitamin D bekannten Wirkungen auf Knochenstoffwechsel und Knochenmineralisation werden neuerdings an Kulturen verschiedener Zellarten (Leukämien, Colon- und Mammakarzinom) auch eine Hemmung der Proliferation und Förderung der Zelldifferenzierung beschrieben. Eine entsprechende antiproliferative endokrine Therapie von Tumoren setzt die Anwesenheit des Vitamin D-Rezeptors voraus.

Ziel der Arbeit war es, eine immunhistochemische Färbemethode zu etablieren, mit deren Hilfe der Vitamin D-Rezeptor in verschiedenen menschlichen Normalgeweben, beim Colon- und Mammakarzinom, sowie beim Mammakarzinom des Hundes und der Katze dargestellt werden kann. Die Ergebnisse wurden mit der Expression des in einigen Geweben durch Vitamin D induzierten Calbindin D(28k) verglichen. Dieses Protein vermittelt in bestimmten Geweben die Vitamin D-Wirkung durch seine Funktion als "transzelluläre Kalziumfahre".

Methoden Für den Nachweis des Vitamin D-Rezeptors wurden Paraffinschnitte nach Vorbehandlung mit Enzymverdauung und Saurehydrolyse immunhistochemisch mit dem Antikörper 9A7 γ und der APAAP-Methode behandelt. Calbindin D(28k) wurde mit dem Antikörper CL-300 nachgewiesen und mit der ABC-Peroxidase-Methode visualisiert.

Ergebnisse In der Niere war der Vitamin D-Rezeptor im gesamten Nephron vorhanden. Die besonders starke Anfärbung der Epithelien des distalen Tubulus entspricht hier der Verteilung des hier selektiv vorhandenen, durch Vitamin D induzierten Calbindin D(28k).

Im Dünndarm konnte der Vitamin D-Rezeptor in Zotten- und Kryptenepithelien nachgewiesen werden, die Färbung auf Calbindin D(28k) war hier allerdings negativ, da im Intestinaltrakt bei Säugetier und Mensch das Calbindin D(9k) den Vitamin D-Effekt vermittelt.

Der positive Nachweis des Vitamin D-Rezeptors in der reifen Plazenta entspricht dem gesteigerten Kalziumbedarf des Feten im letzten Drittel der Gravidität. Die ne-

gative Darstellung von Calbindin D(28k) deutet hier auf eine von Calbindin D(28k) unabhängige Wirkung hin

Epithelzellen der **normalen Colonschleimhaut**, des **Colonkarzinoms**, der **normalen Mamma** und der **Mammakarzinome** zeigen deutliche Mengen von Vitamin D-Rezeptor bei bestehender Negativität auf Calbindin D(28k). Sowohl bei den 37 untersuchten menschlichen Mammakarzinomen als auch bei den 14 Mammakarzinomen von Hund und Katze ergab sich eine von Fall zu Fall unterschiedlich starke Intensität der Vitamin D-Rezeptor-Expression, die mit einer immunhistochemischen Anfärbung auf Progesteron- und Östrogenrezeptoren nicht korrelierte.

Schlußfolgerungen: Eine immunhistochemische Erfassung des Vitamin D-Rezeptors ist entsprechend der vorliegenden Arbeit am Paraffinmaterial sowohl bei menschlichen als auch tierischen Geweben zuverlässig möglich

Aufgrund der beim Colon- und Mammakarzinom gefundenen, von Fall zu Fall unterschiedlich kräftigen Expression des Vitamin D-Rezeptors in den Tumorzellen ist eine **adjuvante Therapie** mit antiproliferativ wirkenden Vitamin D-Analoga in der Humanmedizin prinzipiell denkbar. Dazu wurden sich die kürzlich entwickelten antiproliferativen Vitamin D-Analoga mit weitgehend fehlendem kalzitropen Effekt anbieten. Der immunhistochemische Nachweis der Vitamin D-Rezeptoren konnte dabei zur Identifikation von für diese Therapie geeigneten Fällen herangezogen werden.

Aufgrund der in der Veterinärmedizin aus ökonomischen Gründen in erster Linie praktizierten ablativen Therapie von Mammatumoren kommt den gewonnenen Erkenntnissen vor allem wissenschaftliche Bedeutung zu.

6. SUMMARY

Anke Marie Höfer:

Immunohistochemical detection of vitamin D-receptors and calbindin D(28k) in histologic sections of human and animal tissues

Beside the knowledge of vitamin D effects on Ca^{2+} -metabolism and bone mineralisation, a new era has risen in the vitamin D field with the discovery of the inhibition of cell proliferation and promotion of differentiation in certain cell lines (leucemia, colon and breast cancer)

An appropriate antiproliferative endocrine cancer therapy requires the presence of vitamin D-receptors

The aim of this study was to establish an immunohistochemical method in order to demonstrate the vitamin D-receptor in different normal human tissues, in human colon and breast carcinomas, as well as in mammary carcinomas of dogs and cats. The results have been compared to the expression of calbindin D(28k) which is dependent on vitamin D in certain tissues. Calbindin D(28k) mediates the effects of vitamin D in certain tissues by its function as a transcellular calcium-shuttle-protein.

Methods. To demonstrate the vitamin D-receptor paraffin sections were prepared with enzymatic digestion and acidic hydrolyzation before incubation with 9A7 γ antibody followed by APAAP-procedure. Calbindin D(28k) was detected with CL-300 antibody and visualized by the ABC-peroxidase-method.

Results. In the kidney, vitamin D-receptor was present in all parts of the nephron. A strong staining-reaction was detected in distinct parts of the distal tubules according to the selective presence of vitamin D-induced calbindin D(28k) in this part of the nephron. In the duodenum vitamin D-receptor was particularly detected in epithelial cells of the crypts by a negative staining pattern for calbindin D(28k).

In the intestinal tract of mammals and humans calbindin D(9k) mediates the action of vitamin D.

In the Purkinje-cells of the **cerebellum** the staining pattern for calbindin D(28k) is positive, though there is no immunohistochemical positivity for vitamin D-receptors. This observation confirms results from autoradiographic analysis, which point out the vitamin D-independence of calbindin D(28k) of these cells

The vitamin D-receptor-positivity in the **mature placenta** corresponds to the dramatically increased demand for calcium during the last trimester of gestation, when fetal skeletal mineralisation is occurring. The negative staining of calbindin D(28k) indicates the dependence on calbindin D(9k) in this tissue

Epithelial cells of **normal colon** mucous membrane, **colon cancer**, **normal mammary gland** and **breast cancer** show distinct amounts of vitamin D-receptors beside negative staining of calbindin D(28k). All 37 human breast tumors and 14 canine and feline mammary tumors which have been investigated, show an individually varying staining pattern in each case. There was no correlation between vitamin D-receptor-status and the presence of progesteron- and estrogen-receptors

Conclusions. With respect to these findings a reliable immunohistochemical detection of vitamin D-receptors is possible in paraffin sections of human and certain animal tissues

According to the individually varying staining pattern in different colon and breast cancer-cells, an adjuvant therapy with antiproliferative effective vitamin D-analogs for medical purposes seems promising. For that purpose, newly developed vitamin D-analoga which appear to separate the effects of calcitriol on growth and differentiation from effects on intestinal calcium absorption or bone mineralization would be valuable. The immunohistochemical detection of vitamin D-receptors could serve for the identification of tumors which are qualified for this therapy.

For veterinary purposes the improved findings are primarily of scientific interest, because of common ablative therapy of breast cancer of bitches and cats for economic reasons