

Aus der Klinik für Orthopädie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Prof. Dr. W. Rüter

**Verbesserung der Implantat-Integration durch Parathormon.  
PMMA und Edelstahl im histomorphometrischen Vergleich**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

**Silvia Anna-Gretha Röpke**

aus

Herzberg am Harz

Hamburg 2005

**Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am 22.08.05**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität Hamburg**

Vorsitzender: Prof. Rüter

2. Gutachter: Prof. Lohmann

3. Gutachter: Prof. Meiss

*In Gedenken an meine Großeltern.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>12</b>
2.1 Knochenstoffwechsel . . . . .	12
2.1.1 Morphologie und Physiologie des Knochenstoffwechsels . . . . .	12
2.1.2 Knochenumbau . . . . .	17
2.1.3 Knochenwachstum . . . . .	19
2.1.4 Knochenheilung . . . . .	22
2.2 Parathormon . . . . .	24
2.2.1 Struktur, Biosynthese und Sekretion . . . . .	24
2.2.2 Allgemeine Wirkungen von Parathormon im Organismus . . . . .	26
2.2.3 Anabole Wirkung von PTH auf Knochenzellen . . . . .	27
2.3 Osseointegration . . . . .	29
2.4 Implantatverankerung . . . . .	30
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>32</b>
3.1 Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht . . . . .	32
3.2 Genehmigung des Tierversuchs . . . . .	32
3.3 Tierhaltung und Ernährung . . . . .	32
3.4 Versuchsaufbau . . . . .	32
3.5 Geräte . . . . .	33
3.6 Chemikalien und Verbrauchsmittel . . . . .	33
3.7 Herstellung der Injektionslösungen . . . . .	34
3.8 Implantate . . . . .	35
3.8.1 Herstellung der Implantate . . . . .	35
3.9 Implantation der Metall- und Zementstäbe . . . . .	35
3.9.1 Narkose und Operationsvorbereitungen . . . . .	35
3.9.2 Operationstechnik . . . . .	35
3.9.3 Postoperatives Verfahren . . . . .	35
3.9.4 Implantat-Entnahme . . . . .	38
3.10 Histologische Untersuchung . . . . .	38



3.10.1	Anfertigung der Paraffinschnitte . . . . .	39
3.10.2	Histologische Färbung . . . . .	40
3.10.3	Herstellung der Haematoxylin-Färbung . . . . .	41
3.11	Histomorphometrische Auswertung der Ergebnisse . . . . .	41
3.11.1	Implantat-Knochen-Kontakt . . . . .	41
3.11.2	Knochendichtebestimmung . . . . .	42
3.12	Roughnessmessung . . . . .	44
3.13	Statistische Auswertung . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Der Einfluss von Parathormon auf das Körpergewicht . . . . .	45
4.2	Roughness Auswertung . . . . .	45
4.3	Implantat-Knochen-Kontakt . . . . .	47
4.4	Knochendichte-Bestimmung . . . . .	52
4.5	Knochendichtemessung der Femure . . . . .	57
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1	Anabole Eigenschaften von PTH . . . . .	61
5.2	Mögliche intrazelluläre Mechanismen der PTH-Wirkung . . . . .	62
5.3	Ist der PTH-Effekt auf regenerierenden Knochen größer als auf normalen spongiösen Knochen? . . . . .	63
5.4	Kann PTH die Integration eines Edelstahl- bzw. eines PMMA-Implantats verbessern? . . . . .	65
5.5	PTH-induzierte Knochenintegration im Stahl- und PMMA-Implantat . . . . .	66
5.6	Ist der PTH-Effekt zeitabhängig? . . . . .	67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Topographische Beziehungen der Knochenzellen . . . . .	13
2	Entwicklung der Osteoblasten . . . . .	14
3	Die drei Theorien zur Entstehung der Osteoklasten . . . . .	16
4	Bone-Remodeling . . . . .	18
5	Knochenbildung . . . . .	19
6	Desmale Ossifikation . . . . .	20
7	Zonen der chondralen Ossifikation . . . . .	21
8	Sekundäre Knochenheilung . . . . .	23
9	Das Prä-Pro-PTH-Gen . . . . .	25
10	Tibia (Quer) mit Implantat (Schema) . . . . .	36
11	OP-Material . . . . .	36
12	Implantation des Metallstabs . . . . .	37
13	Tibia mit PMMA-Stab . . . . .	38
14	Tibia mit Metallstab . . . . .	38
15	Femur . . . . .	39
16	Arbeitsplatz . . . . .	41
17	Messung des Implantat-Knochenkontakts . . . . .	42
18	Merz-Grid 3600x3600 $\mu\text{m}$ . . . . .	43
19	gew1 . . . . .	46
20	gew2 . . . . .	46
21	gew3 . . . . .	46
22	gew4 . . . . .	47
23	Edelstahl Implantat . . . . .	48
24	PMMA Implantat . . . . .	49
25	Knochenkontaktanteil PMMA-Implantate . . . . .	51
26	Knochenkontaktanteil Metallimplantate . . . . .	51
27	Differenz PMMA/Metall . . . . .	52
28	Kontrollgruppe, 2 Wochen, Zementstab (1,25x1) . . . . .	53
29	PTH-Gruppe, 2 Wochen, Zementstab (1,25x1) . . . . .	53
30	Kontrollgruppe, 4 Wochen, Zementstab (1,25x1) . . . . .	54

31	PTH-Gruppe, 4 Wochen, Zementstab (1,25x1) . . . . .	54
32	Kontrollgruppe, 2 Wochen, Metallstab (1,25x1) . . . . .	55
33	PTH-Gruppe, 2 Wochen, Metallstab (1,25x1) . . . . .	55
34	Kontrollgruppe, 4 Wochen, Metallstab (1,25x1) . . . . .	56
35	PTH-Gruppe, 4 Wochen, Metallstab (1,25x1) . . . . .	56
36	Knochendichte der Tibiae (PMMA) in % (Merz-Grid-Auswertung, 50 × 1,25) . . . . .	58
37	Knochendichte der Tibiae (Stahl) in % (Merz-Grid-Auswertung, 50 × 1,25) . . . . .	59
38	Knochendichte der Femure in % (Merz-Grid-Auswertung) . . . . .	59

## Tabellenverzeichnis

1	Aminosäuresequenz von PTH (homologe Aminosäuren fett gedruckt) ( <i>aus</i> : DUVOS, 1995, S. 2) . . . . .	26
2	Vorkommen von Rezeptoren für PTH . . . . .	27
3	Gruppeneinteilung der Tiere . . . . .	32
4	Dehydratationsschritte . . . . .	39
5	bla . . . . .	45
6	Knochenkontaktanteil . . . . .	47
7	Seitenvergleich PMMA/Edelstahl . . . . .	50
8	ANOVA-Tabelle, PMMA-Knochenkontakt . . . . .	50
9	ANOVA-Tabelle, Stahl-Knochenkontakt . . . . .	50
10	Volumetrische Dichte der Tibiae . . . . .	57
11	Oberflächendichte der Tibiae . . . . .	57
12	Spezifische Oberfläche der Tibiae . . . . .	58
13	Volumetrische Dichte der Femure . . . . .	60
14	Vergleich der Volumetrischen Dichte [%] nach 2 und nach 4 Wochen . . . . .	64
15	Differenz des Knochenkontaktanteils zwischen PMMA und Stahl . . . . .	67
16	2 und 4 Wochen PTH-Behandlungsdauer im Vergleich . . . . .	68
17	Volumetrische Dichte der PTH-behandelten Tiere im 2 und 4 Wochen-Vergleich . . . . .	68

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA	Carboanhydrase
Ca <sup>++</sup>	Calcium
Ca <sup>++</sup> /PKC-System	Calcium/Proteinkinase C-System
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP/PKA- System	cyclisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A-System
CFU-F	Colony forming unit fibroblastic
Co	Kobalt
Cr	Chrom
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
E-Modul	Elastizitätsmodul
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellularraum
F	Phenylalanin
G	Glycin

## Abkürzungsverzeichnis

---

H	Histidin
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hPTH	humanes Parathormon
HWZ	Halbwertszeit
I	Isoleucin
IEG	Immediate Early Genes
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IL	Interleukin
K	Lysin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Leucin
LWK	Lendenwirbelkörper
M	Methionin
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
N	Asparagin
NaJO <sub>3</sub>	Natriumjodat
OPG	Osteoprotegerin
P	Prolin
PMMA	Polymethylmethacrylat (Knochenzement)

## Abkürzungsverzeichnis

---

PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related Protein
Q	Glutamin
R	Arginin
RANK	receptor activator of NF <sub>κ</sub> B
RANKL	receptor activator of NF <sub>κ</sub> B-ligand
S	Serin
S <sub>v</sub>	Oberflächendichte
S/V	Spezifische Oberfläche
T	Threonin
Tab	Tabelle
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
μg	Mikrogramm
V <sub>v</sub>	Volumetrische Dichte
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Über den anabolen Effekt von Parathormon (PTH) existieren bisher nur wenige Studien, selbige beziehen sich vor allem auf die Behandlung der Osteoporose.

Die wenigen Studien zum Effekt von PTH auf die Frakturheilung (KIM et al., 1997; ANDREASSEN et al., 1999; HOLZER ET AL., 1999) konnten zeigen, dass durch die intermittierende Gabe von PTH die Frakturheilung verbessert werden kann. PTH erhöht nicht nur die Zahl der Osteoblasten, sondern auch deren Aktivität, was zu einer verstärkten Kallusbildung, einer höheren Knochendichte und somit zu einer Beschleunigung der Frakturheilung führt (HOLZER ET AL., 1999). Folglich liegt es nahe, den Effekt von PTH auf die Implantat-Integration zu untersuchen, denn die Vorgänge beim Einwachsen von Knochen in das Implantat nach „iatrogener Fraktur“ entsprechen denen der Knochenheilung. Allein in Schweden wurden in der Zeit von 1986 bis 1994 84.884 primäre Hüftgelenkoperationen durchgeführt. 12 % ( $n = 10176$ ) der Patienten mussten sich 1996 einer Revisionsoperation aufgrund von Prothesenlockerung oder Materialversagens unterziehen (SÖDERMANN, 2000). Klinisch ist die initiale Migration des Implantats während der ersten 6 postoperativen Monate von entscheidender Bedeutung für eine potentielle Lockerung der Prothese 5 bis 8 Jahre später (ASPENBERG, VAN DER VIS, 1998). Hierbei spielt v.a. die Bildung eines direkten Kontaktes zwischen Implantat und Knochen eine wesentliche Rolle für die Primärstabilität (ASPENBERG, VAN DER VIS, 1998). Frühere Studien zeigten bereits, dass die intermittierende Gabe von Parathormon (PTH) nicht nur die Osteoblastenaktivität stimuliert, sondern auch die mechanische Festigkeit des Knochens erhöht. Ist es möglich, die Primärfixation von Prothesen durch PTH zu verbessern, könnte damit ein späterer Revisionseingriff vermieden bzw. herausgezögert werden. In dieser Studie soll der PTH-Effekt auf das Implantateinwachsverhalten histomorphometrisch untersucht werden, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist der PTH-Effekt auf regenerierenden Knochen größer als auf normalen spongiösen Knochen?
2. Kann PTH die Integration eines Edelstahl- bzw. eines PMMA-Implantats verbessern?
3. Unterscheidet sich die PTH-induzierte Knochenintegration im Stahlimplantat von der im PMMA-Implantat?
4. Ist der PTH-Effekt zeitabhängig? Eine 2- und eine 4-Wochen-Gruppe im Vergleich.

## 2 Einleitung

### 2.1 Knochenstoffwechsel

#### 2.1.1 Morphologie und Physiologie des Knochenstoffwechsels

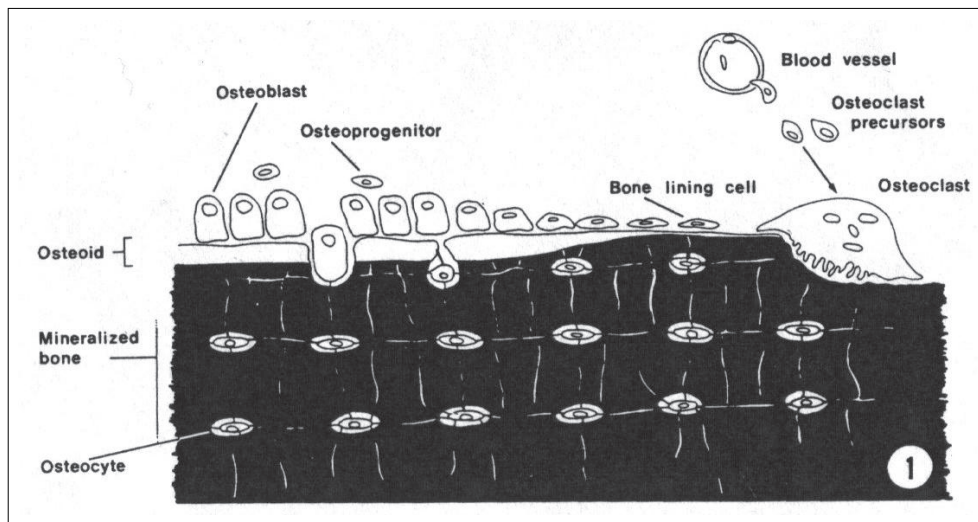
Wesentliche Aufgaben des Knochens sind zum einen die Stütz- und Schutzfunktion und zum anderen die Mitregulation des Calciumstoffwechsels. Rund 99 % des Gesamtkörpercalciums sind im Knochen gebunden, so dass durch Knochenan- bzw. -abbau eine Anpassung des Calciumspiegels an die jeweiligen Bedürfnisse des Organismus möglich ist. Die für die Stützfunktion erforderliche mechanische Belastbarkeit wird erreicht durch die lamelläre Struktur des Knochengewebes. Die äußere kompakte Schicht des Knochens, die sogenannte Kortikalis, zeigt einen charakteristischen Aufbau aus zylindrischen Osteonen (Havers-Systeme), welche aus 4–20 konzentrisch um einen Zentralkanal (Havers-Kanal) verlaufende Lamellen bestehen. Das schwammartige Knocheninnere mit seinen Hohlräumen und Trabekeln, die sogenannte Spongiosa, deren Verlauf die Hauptbelastungsrichtung widerspiegelt, demonstriert zugleich die Leichtbauweise des Knochens. Außen wird der Knochen vom Periost bedeckt, einer Bindegewebsschicht, die reich an Nerven ist und in der die zur Ernährung des Knochens dienenden Gefäße liegen. Zum Markraum hin wird die Kortikalis vom Endost begrenzt. Knochenzellen liegen in vier verschiedenen Formen vor (siehe Abb. 1):

- Osteoblasten
- Bone lining cells
- Osteoklasten
- Osteozyten

Die Osteogenese der einzelnen Knochenzellen verläuft unterschiedlich. So stammen Osteoblasten, Bone Lining Cells und Osteozyten von einer Vorläuferzelle, der sogenannten Osteoprogenitorzelle, ab (siehe Abb. 2). Diese Zelle wiederum ist mesenchymaler Herkunft und entsteht aus einer pluripotenten mesenchymalen Stammzelle, von der letztlich auch die Fibroblasten, Retikulozyten und Endothelzellen abstammen.

Die spindelförmigen Vorläuferzellen liegen an Knochenoberflächen, im Periost und Endost, sowie in den Havers-Kanälen neben den Osteoblasten (FRIEDENSTEIN, 1976), von denen sie sich durch

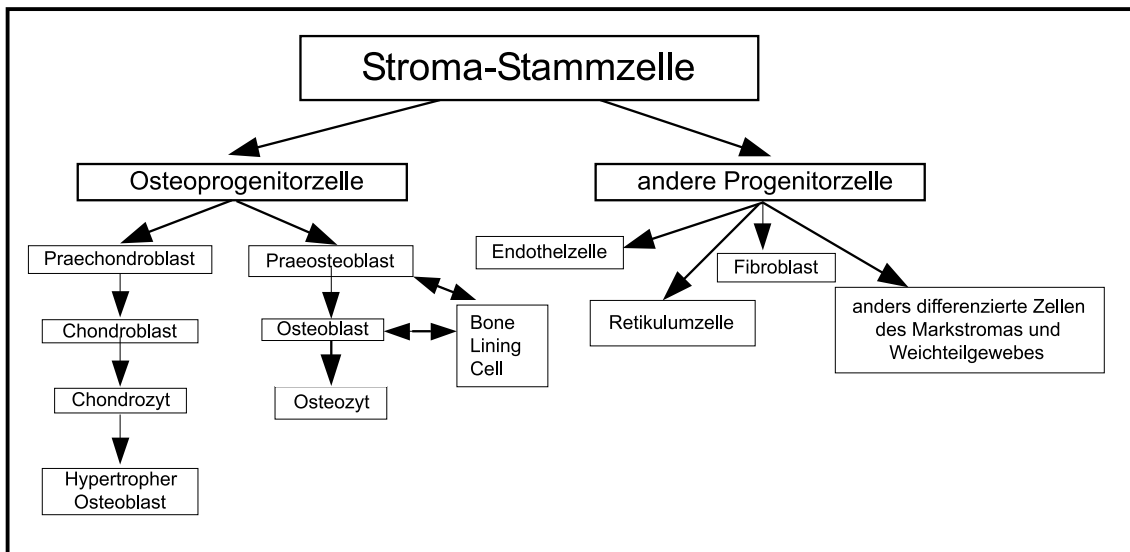




**Abb. 1:** Topographische Beziehungen der Knochenzellen (aus: MARKS, POPOFF, 1988, S. 1)

ihr weniger basophiles Plasma unterscheiden. Histologisch sind die Vorläuferzellen relativ undifferenziert mit einem spärlich ausgebildeten Golgi-Apparat und nur wenig rauem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Osteoprogenitorzelle ist während des Knochenwachstums aktiv, kann jedoch auch später, z.B. bei einem Knochenbruch, wieder aktiviert werden.

Die **Osteoblasten** reifen unter der Einwirkung von Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse und Calcitriol, welches vor allem in der Niere gebildet wird, und produzieren daraufhin vermehrt Wachstumsfaktoren wie den Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ , alkalische Phosphatase und Osteocalcin. Ansonsten sind sie für die Synthese von Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykoproteinen, die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz, Osteoid genannt, zuständig. Das zunächst noch weiche Osteoid erhält jedoch erst durch die Einlagerung der Kalksalze die für den Knochen charakteristische Härte. 5–10 % der Osteoblasten werden mit zunehmender Osteoidbildung allmählich eingemauert und somit zu Osteozyten. Damit trotz Einmauerung ein interzellulärer Fluss von Ionen und kleinen Molekülen möglich ist und die Osteozyten mit den Osteoblasten in Kontakt bleiben, sind sie über zahlreiche Zellfortsätze und *gap junctions* mit benachbarten Osteozyten und den Osteoblasten an der Oberfläche verbunden. In der Synthesephase verfügen die kubisch bis hochprismatischen Zellen der Osteoblasten über ein gut entwickeltes raues ER sowie einen ausgeprägten Golgi-Apparat als Zeichen aktiver, proteinbildender Zellen. Neben Kollagen Typ I und weiteren Matrixsubstanzen sezernieren sie alkalische Phosphatase, deren Aktivität im Serum zur Beurteilung der Osteoblastentätigkeit dient. Eine erhöhte Enzymkonzentration spricht für einen



**Abb. 2:** Entwicklung der Osteoblasten (aus: MARKS, POPOFF, 1988, S. 20)

gesteigerten Knochenanbau (Wachstumsphase, Frakturheilung). Ein weiteres Syntheseprodukt der Osteoblasten sind zudem Botenstoffe wie Prostaglandine, Interleukine, TGF  $\beta$ 1-5, bone morphogenetic proteins (BMP)1-12 sowie Somatomedine (insulin like growth factors I und II), welche die Vermehrung, die Differenzierung und Funktion der Knochenzellen stimulieren. Ein Teil von ihnen wird in inaktiver Form in die Knochenmatrix eingebaut und kann später bei Knochenumbau (remodeling) oder nach einer Knochenverletzung durch Enzyme, die vor allem aus den Osteoklasten stammen, aktiviert werden. Über das sogenannte RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System (*receptor activator of NF $\kappa$ B-ligand*) sind die Osteoblasten ganz wesentlich an der Steuerung des Heranreifens und der Aktivität der Osteoklasten beteiligt. So wird z.B. bei sinkendem Calciumspiegel vermehrt PTH ausgeschüttet, das über einen Rezeptor nur an die Osteoblasten, nicht jedoch an die Osteoklasten binden kann. Erstere bilden daraufhin RANKL, der an seinen Rezeptor RANK auf der Zelloberfläche von Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen bindet. Durch die vermehrte Bildung und Aktivität der Osteoklasten wird somit durch verstärkte Knochenresorption der Calciumspiegel angehoben. (KORNAK ET AL., 2003)

Die **Osteozyten** dienen der Knochenerhaltung; gehen sie zugrunde, so wird die sie umgebende Matrix abgebaut. Da in unmittelbarer Umgebung der Osteozyten die Mineralisation der Knochenmatrix gehemmt wird, liegen die Zellen in Lakunen, von wo aus sie durch ihre zahlreichen Zellfortsätze mit anderen Zellen verbunden sind, wodurch ihr charakteristisches Aussehen bestimmt

wird. Die Zellfortsätze verlaufen in Kanälen (*canaliculi ossei*), über die Ionen und kleine Moleküle bis zu 15 Zellen weit transportiert werden können. Durch diesen besonderen Aufbau wird die Zelloberfläche stark vergrößert. So beträgt z.B. die Oberfläche der Kanalwände eines Erwachsenen  $300 \text{ m}^2$  (SIMON, 1994).

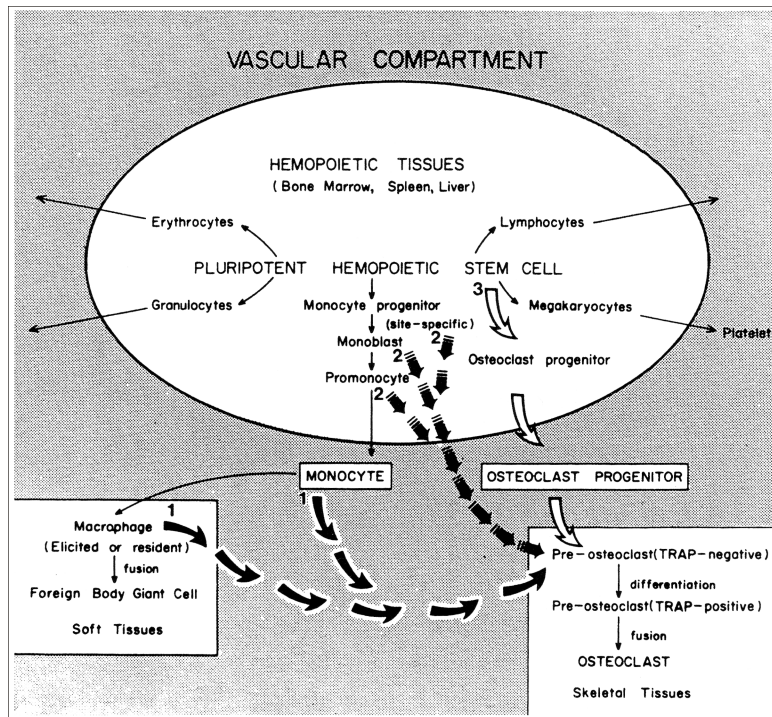
Die aus den Osteoblasten hervorgegangenen Zellen besitzen einen mandelförmigen Zelleib mit vergleichsweise wenig rauem ER, einem kleinen Golgi-Apparat und einem dichten chromatinreichen Kern. Dies zeigt, dass gegenüber den Osteoblasten nur eine verminderte Syntheseaktivität vorliegt. Funktionell kann man zwei Formen der Osteozyten unterscheiden:

1. osteoblastische Osteozyten
2. osteolytische Osteozyten

Osteoblastische Osteozyten dienen vor allem der Erhaltung der vorhandenen Grundsubstanz. Sie enthalten, wie die Osteoblasten, protein- und glykoproteingebundenes Calciumphosphat und sind in der Lage, es in ihrem Cytoplasma zu konzentrieren. Calcium und Phosphat werden dann später zum Aufbau der interzellulären Hartschubstanz verwendet. Osteolytische Osteozyten enthalten viele Lysosomen und befinden sich hauptsächlich in tieferen Knochenschichten. Hier bauen sie Hartschubstanz ab und sind so in der Lage, Calcium aus dem Knochen freizusetzen.

**Bone Lining Cells** sind flache, längliche inaktive Zellen mit nur wenigen Organellen, die den Knochen bedecken, der sich weder im Abbau noch im Aufbau befindet. Durch *gap junctions* sind die Zellen untereinander und mit benachbarten Osteozyten verbunden. Über die genaue Funktion der Bone Lining Cells ist nur wenig bekannt, man vermutet jedoch, dass sie potentielle Progenitorzellen der Osteoblasten sind, als selektive Barriere zwischen Knochengewebe und anderem extrazellulären Gewebe fungieren bzw. dass sie zur Regulation des Kristallwachstums dienen (MARKS, POPOFF, 1988).

Die Abstammung der **Osteoklasten** war lange unklar und ist auch heute noch nicht vollständig erwiesen. Insgesamt existierten drei Theorien zu ihrer Entwicklung (siehe Abb. 3). Zunächst glaubte man, dass sie durch Fusion von Monozyten/Makrophagen entstehen (Theorie 1), was jedoch widerlegt werden konnte. Anschließend vermutete man einen gemeinsamen „Vorfahren“, z.B. in Form von Monoblasten oder Promonozyten, von Makrophagen und Osteoklasten (Theorie 2). Heute hat sich jedoch die dritte aller Theorien durchgesetzt, nämlich dass die Zelllinien von Osteoklasten und Makrophagen/Monozyten vollständig voneinander getrennt sind und dass sie von einer



**Abb. 3:** Die drei Theorien zur Entstehung der Osteoklasten (1-3) (aus: MARKS, POPOFF, 1988, S. 1)

pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle abstammen (Theorie 3) (MARKS, POPOFF, 1988).

**Osteoklasten** sind mehrkernige Riesenzellen, die in Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen, liegen. Die Zellen sind reich an Mitochondrien, was auf ihren großen Energiebedarf hinweist, Vakuolen und Lysosomen. Auf der dem Knochen zugewandten Resorptionsseite besitzen aktive Osteoklasten eine kammartig aufgefaltete Zellmembran, wodurch die sezernierende und resorbierende Oberfläche erheblich vergrößert und die als *ruffled membrane* bezeichnet wird. Seitlich wird dieser Bereich, unter dem die Resorption stattfindet, von einer fast zellorganellfreien Zytoplasmazone (clear zone) begrenzt, die sich an die Knochenoberfläche heftet und so das darunterliegende Reaktionskompartiment mit einem pH-Wert von 3,5 begrenzt. Osteoklasten sind gleichzeitig „Enzym-Fabrik“ und „Recyclingcenter“. Die synthetisierten Enzyme, insbesondere saure Hydrolasen, werden im perinukleären Golgi-Apparat in primäre Lysosomen verpackt und durch Exozytose in den extrazellulären Raum, in dem ein saures Milieu herrscht, abgegeben. Hierzu katalysiert die auf der Cytoplasma-Seite liegende Carboanhydrase II die Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu Bicarbonat und  $\text{H}^+$ -Ionen. Die Wasserstoffionen werden anschließend durch die ATPase nach außen gepumpt und sorgen so für ein optimales Milieu der Hydrolasen. Resorptionsprodukte, wie z.B. calciumhaltige Kristalle, werden durch Endozytose wieder von den Osteoklasten aufgenommen,

in sekundären Lysosomen weiter abgebaut und das verbleibende Material in benachbarte Gefäße abgegeben.

Ein Osteoklast kann pro Zeiteinheit die gleiche Knochenmenge abbauen, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wurde. Dies erfordert eine effiziente Kontrolle wie sie durch Calcitonin geschieht. Innerhalb weniger Minuten ist es in der Lage, die Osteoklastenaktivität zu senken. Eine Steigerung der Osteoklastentätigkeit wird vor allem durch Botenstoffe der Osteoblasten erreicht, wie z.B. Prostaglandin E2 und Zytokine, die nach Bindung von PTH von den Osteoblasten freigesetzt werden. Da die Osteoklasten selbst keinen PTH-Rezeptor besitzen, erfolgt ihre Aktivierung, z.B. im Falle eines sinkenden Calciumspiegels, indirekt über die Osteoblasten. Diese produzieren RANKL, um an dessen Rezeptor RANK, der sich auf den Osteoklasten, bzw. deren Vorläuferzellen befindet, zu binden. Es folgt eine verstärkte Knochenresorption, die einen Anstieg des Calciumspiegels bewirkt.

Die vermehrte Bildung von Osteoklasten wird auch durch den *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) gefördert, dessen Sekretion durch die Osteoblasten mithilfe von Interleukin(IL)-1 und des Tumornekrosefaktors (TNF) angeregt und durch Östradiol gehemmt wird.

Unter dem Einfluss von Östradiol produzieren die Osteoblasten zudem Osteoprotegerin (OPG), welches eine Variante von RANK ist und zwar RANKL bindet, jedoch keine Signaltransduktion hervorruft und somit die Osteoklasten hemmt (KORNAK ET AL., 2003).

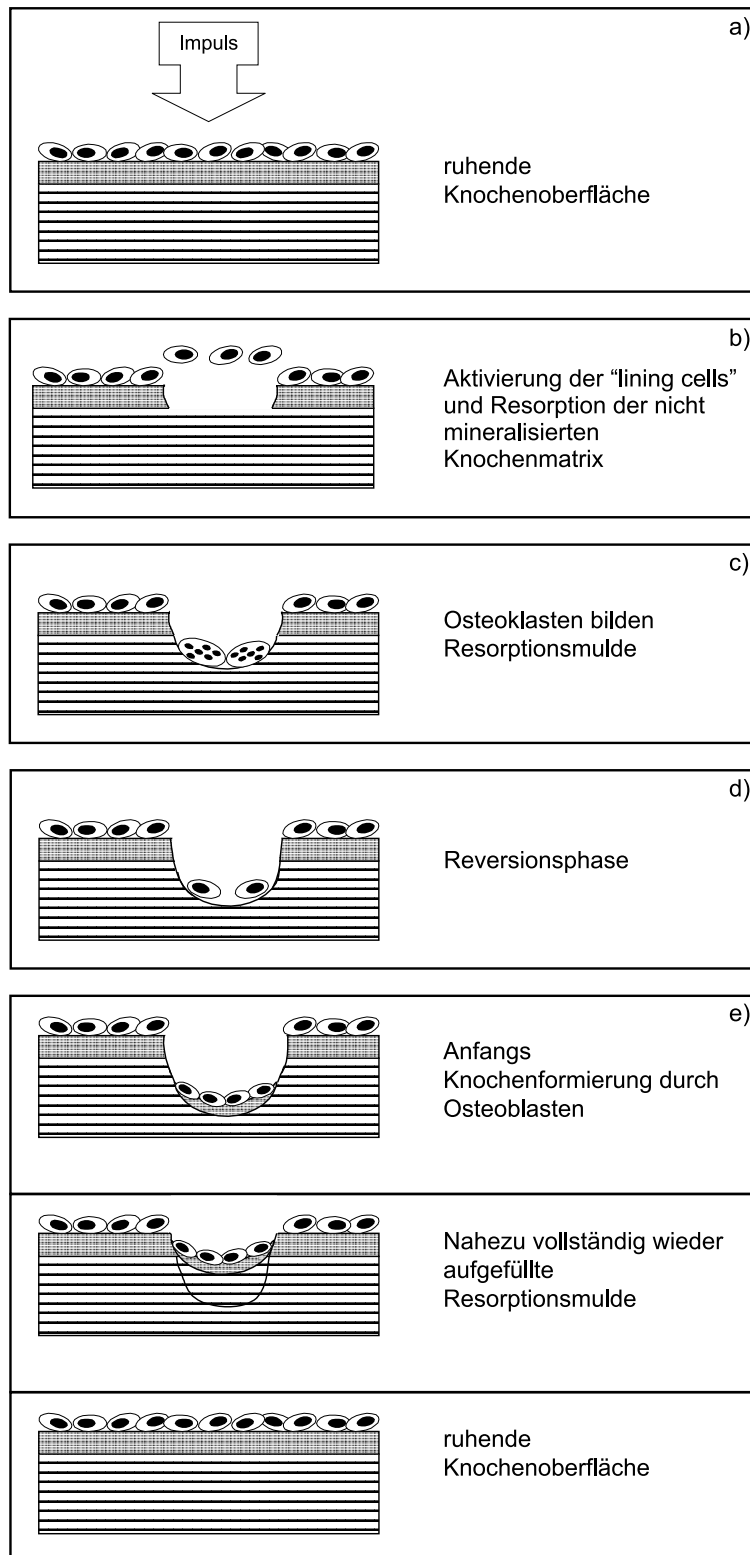
Calcitriol stimuliert ebenfalls die Osteoklastenaktivität.

### 2.1.2 Knochenumbau

Das Skelettsystem unterliegt einem ständigen Umbau, wobei die Knochenmasse, vom physiologischen Altersskelettverlust abgesehen, konstant bleibt. Das sogenannte Remodeling wird nach einem Modell von FROST in fünf verschiedene Phasen unterteilt (Abbildung 4, a–e, Seite 18):

- 1. Initiation:** Durch einen Impuls wird der Zustand der ruhenden Knochenoberfläche mit ihren Bone Lining Cells verändert und durch Formänderung dieser Zellen ein Remodeling-Zyklus möglich. (Abbildung 4a)
- 2. Aktivation:** Zelluläre Antwort auf den Initiationsimpuls durch Bereitstellung von Enzymen zur Resorption (Abbildung 4b)
- 3. Resorption:** Entfernung der organischen und anorganischen Matrix (Dauer: ca. 5 Wochen) (Abbildung 4c)

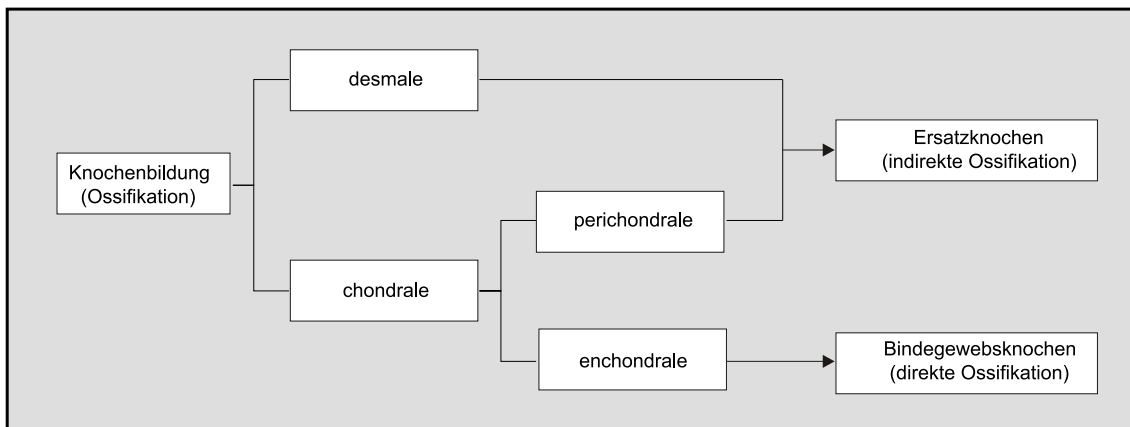
## 2.1 Knochenstoffwechsel



**Abb. 4:** Bone-Remodeling (modifiziert nach einem Schema aus BUBECK, 1994, S. 4)

4. **Reversal:** (Umschaltphase) Resorptionsbeendigung und Aktivierung des Osteoblastensystems durch Synthese von Wachstumsfaktoren wie IGF-I oder TGF- $\beta$ . (Abbildung 4d)
5. **Formation:** Auffüllung des Defektes mit Osteoid und Mineralisation (Dauer: ca. 20 Wochen) (Abbildung 4e)

### 2.1.3 Knochenwachstum



**Abb. 5:** Knochenbildung (aus: BUCHER, WARTENBERG, 1997, S. 129)

Bei der Knochenbildung (siehe Abb. 5), Ossifikation genannt, unterscheidet man zunächst die desmale oder auch direkte von der chondralen oder auch der indirekten Ossifikation. Die indirekte Knochenbildung wiederum kann man erneut in die perichondrale und die enchondrale Ossifikation einteilen.

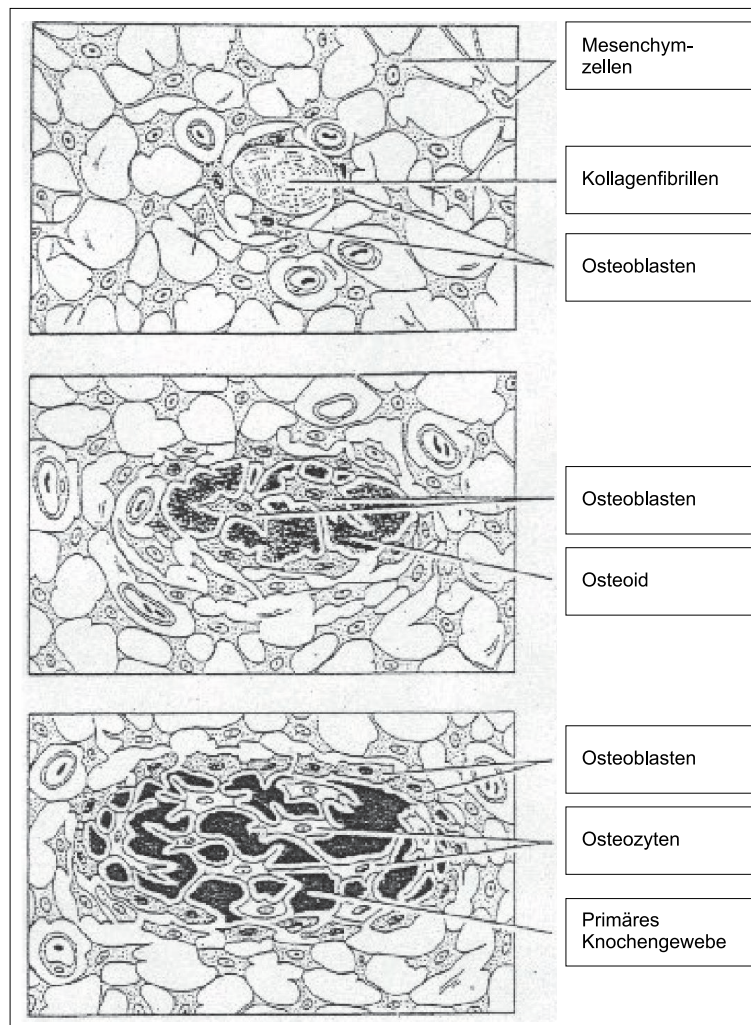
#### Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation findet vor allem an den Knochen des Schädeldaches sowie der Mehrzahl der Gesichtsknochen und dem Schlüsselbein statt (siehe Abb. 6). Dabei vermehren sich zunächst Mesenchymzellen, die sich anschließend zu Osteoblasten differenzieren. Diese produzieren daraufhin die proteoglykanhaltige Grundsubstanz, das Osteoid, welches durch Einlagerung von Hydroxylapatit verkalkt und somit zu Bindegewebsknochen führt.

#### Chondrale Ossifikation

Nach dem Ort der Knochenbildung unterscheidet man perichondrale und enchondrale Ossifikation. Während erstere grundsätzlich wie die desmale Ossifikation verläuft, ist die enchondrale





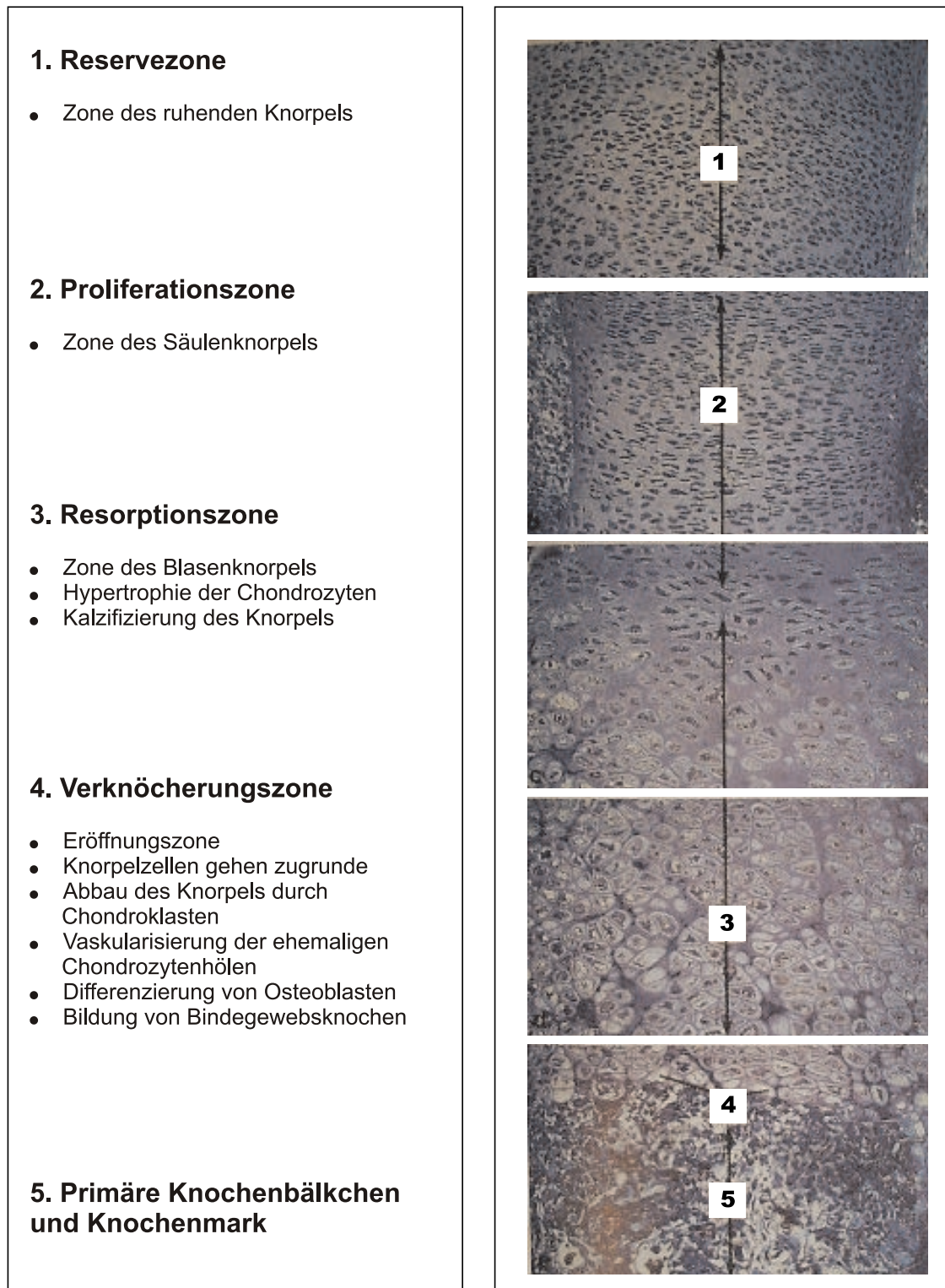
**Abb. 6:** Desmale Ossifikation (aus: JUNQUERA, 1996, S. 203)

Knochenbildung weitaus komplizierter, da zunächst das Knorpelgewebe aufgelöst werden muss, um genügend Raum für den Ersatzknochen zu schaffen.

#### *Perichondrale Ossifikation*

Sie findet in der Schaftmitte (Diaphyse) von langen Röhrenknochen statt und beginnt damit, dass die Osteoblasten des Perichondriums, der Haut des Knorpelskeletts, Osteoid bilden, welches entsprechend der desmalen Ossifikation verkalkt. Damit bildet sich eine Art Knochenmanschette, die die langen Röhrenknochen einschient, so dass nun die Resorptionsvorgänge der enchondralen Ossifikation keinen Verlust der Stabilität verursachen.





**Abb. 7:** Zonen der chondralen Ossifikation (aus: BUCHER, WARTENBERG, 1997, S. 135)

### *Enchondrale Ossifikation*

Die Knochenmanschette beeinträchtigt die Ernährung des Diaphysenknorpels, so dass die Chondrozyten hypertrophieren (Blasenknorpel) und die Knorpelgrundsubstanz verkalkt, was später zur Degeneration des Knorpels führt. An der Oberfläche der Knochenmanschette verursachen Osteoklasten indes „Löcher“ in der Manschette, durch die Blutgefäße aus dem Periost in den geschädigten Knorpel einwachsen können. Es folgen weitere Ab- und Umbauvorgänge, so dass schließlich die primäre Markhöhle entsteht. Wie in Abbildung 7 dargestellt, lassen sich im Bereich von der Epiphysenfuge bis zur primären Markhöhle verschiedene Zonen unterscheiden.

### **2.1.4 Knochenheilung**

Der Knochen ist zur organotypischen Regeneration fähig, d. h. Knochendefekte werden durch neu gebildetes Knochengewebe und nicht durch minderwertiges Narbengewebe ersetzt. Die Knochenneubildung kann vom Endost, dem Periost und dem Havers-System ausgehen. Man unterscheidet die primäre von der sekundären Frakturheilung:

#### **Primäre Frakturheilung**

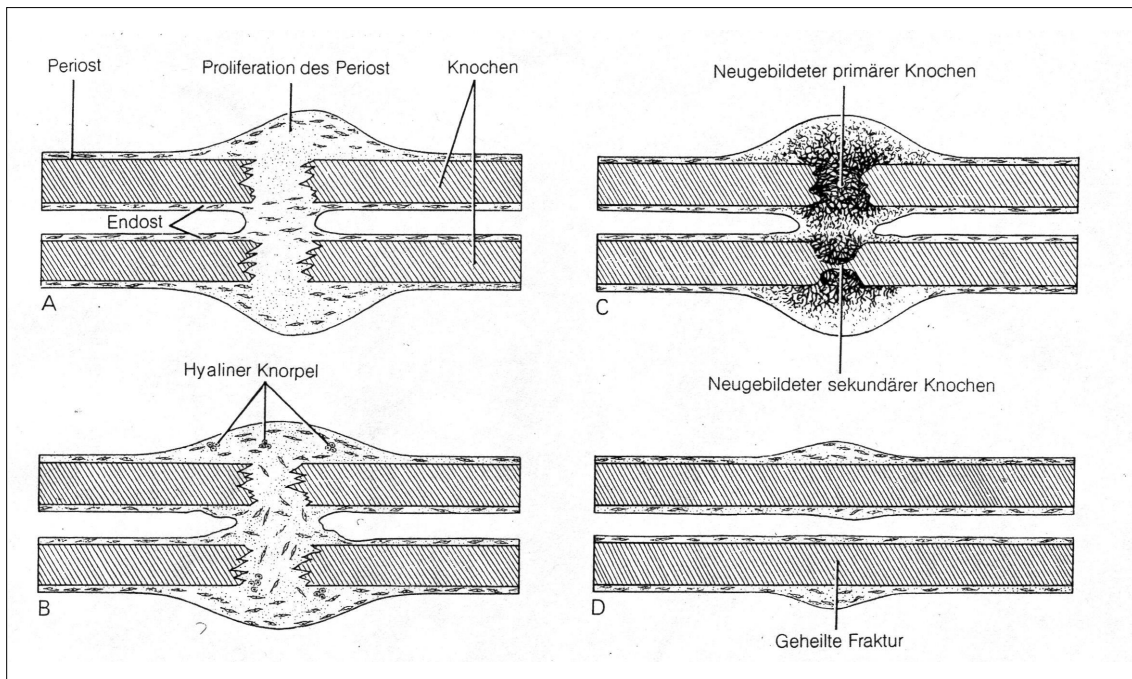
Voraussetzung für eine primäre Heilung sind ein enger Kontakt der Frakturflächen ( $< 1$  mm), wie es in der Regel nur bei operativer Frakturbehandlung mittels verschiedener Osteosyntheseverfahren der Fall ist, sowie eine absolute Ruhigstellung. Diese sogenannte Kontaktheilung erfolgt analog zur normalen Bildung kortikaler Osteone. Hierbei erfolgt zunächst eine Resorption durch die Osteoklasten entlang der Bruchfläche. Osteoblasten kleiden diesen Defekt anschließend wie beim normalen Remodeling mit Osteoid aus. Es erfolgt also keine Kallusbildung.

#### **Sekundäre Knochenheilung**

Liegen die Frakturrenden weiter als 1 mm auseinander, so erfolgt die Knochenheilung in mehreren Schritten (siehe Abbildung 8 auf Seite 23):

##### *Stadium 1: Entzündung*

(Abbildung 8-A) Sie beginnt bereits direkt nach einer Fraktur durch Entstehung eines Haematoms und eines Fibringerinnsels bestehend aus Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Durch die Verletzung von Gefäßen kommt es außerdem zu einer Blutung und zur Nekrose von Zellen. Es folgt die Einwanderung von Fibroblasten, mesenchymaler Zellen sowie Osteoprogenitorzellen und das Einsprossen von Gefäßen.



**Abb. 8:** Sekundäre Knochenheilung (aus: JUNQUERA, 1997, S. 211)

*Stadium 2: Bindegewebiger Kallus*

(Abbildung 8-B) Diese Phase beginnt nachdem Schmerz und Schwellung nachgelassen haben und endet, sobald die Knochenfragmente durch fibröses oder knorpeliges Gewebe verbunden sind und somit nicht mehr frei beweglich sind. Der bindegewebige Kallus entsteht durch Ausbildung eines kapillarreichen Granulationsgewebes und Proliferation von Fibroblasten.

*Stadium 3: Knöcherner Kallus*

(Abbildung 8-C) Die Fibroblasten des Bindegewebskallus werden umgewandelt in osteoidproduzierende Osteoblasten und durch zunehmende Mineralisation entsteht ein aus Faserknochen aufgebaute vorläufiger knöcherner Kallus.

*Stadium 4: Remodeling*

(Abbildung 8-D) Durch den mechanischen Reiz allmählicher Belastung erfolgt die Umwandlung des Faserknochens in den endgültigen Lamellenknochen. Nach Resorption überschüssiger Knochenanteile durch Osteoklasten kommt es zur Wiederherstellung der normalen Knochenarchitektur durch die Osteoblasten.

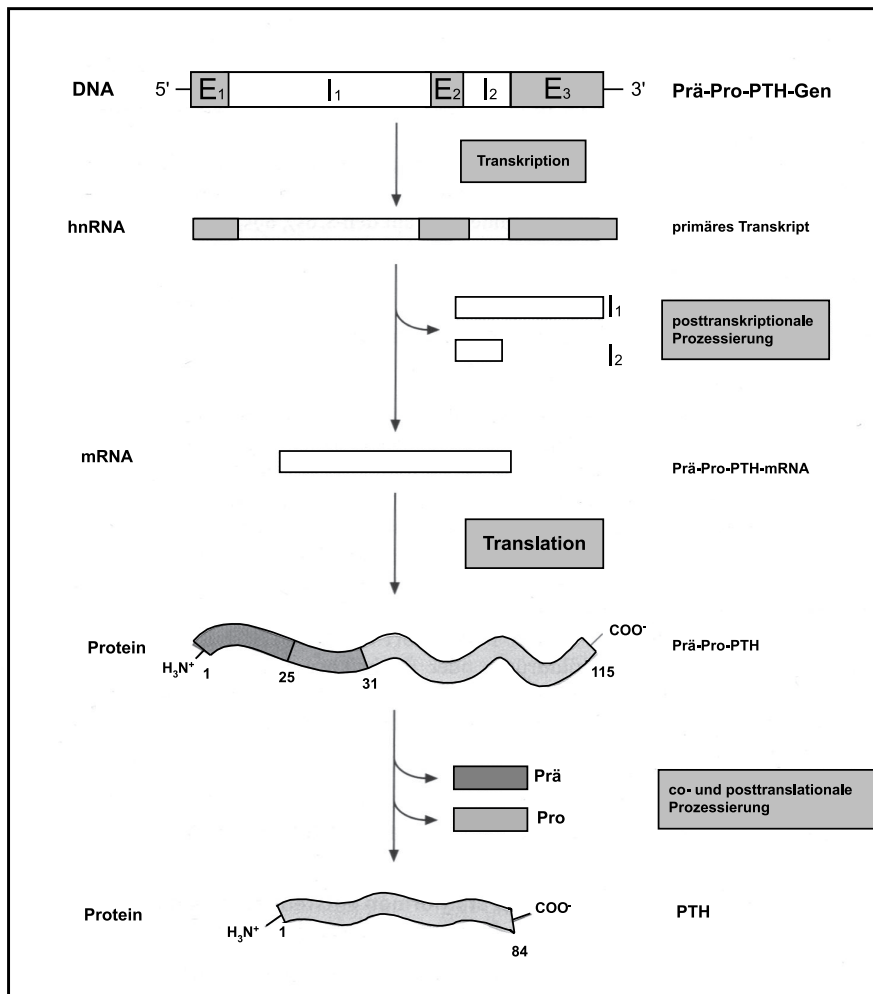
## 2.2 Parathormon

### 2.2.1 Struktur, Biosynthese und Sekretion

Das Parathormon (PTH) ist ein Polypeptid, welches in den Nebenschilddrüsen, auch Epithelkörperchen genannt, gebildet wird und aus einer Sequenz von 84 Aminosäuren besteht. Die Biosynthese des Hormons verläuft über mehrere Zwischenprodukte, so dass zunächst das aus 115 Aminosäuren bestehende Prael-Pro-PTH entsteht (siehe Abb. 9). Im rauhen ER wird anschließend die 25 Aminosäuren (AS) lange Signalsequenz des Moleküls abgespalten, so dass als weiteres Zwischenprodukt das Pro-PTH mit 90 AS gebildet wird, welches jedoch nur für 15 Minuten, die Zeit des intrazellulären Transports, existiert (POTTS, KRONENBERG, 1982). Die genaue Funktion der Pro-Sequenz ist unklar, man vermutet jedoch, dass die beiden letzten AS, Lysin und Arginin, den Spaltenzymen zur Erkennung der Schnittstelle dienen. Das Pro-Hormon wird wiederum durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Hexapeptids im Golgi-Komplex zum wirksamen 9500 Dalton schweren PTH umgewandelt.

Während es COLLIP bereits 1925 gelang, PTH aus den Epithelkörperchen zu extrahieren, so konnte die Aminosäuresequenz des humanen PTHs jedoch erst im Jahre 1978 durch KEUTMANN et al. aufgeklärt werden. Zuvor jedoch entdeckte man 1970 die Sequenz bei Rindern (durch BREWER und RONAN bzw. durch NIELL et al.), 1974 die des Schweins (SAUER et al.) und etwas später, 1984, die der Ratte (HEINRICH et al.) Das PTH der verschiedenen Spezies besitzt einen hohen Homologiegrad und unterscheidet sich in nur wenigen AS (siehe Tab. 1). Die größte Differenz besteht im mittleren Drittel, während im N-terminalen ersten Drittel (AS 1–38) eine hohe Übereinstimmung von bis zu 95 % herrscht, was, wie sich später herausstellte, für die volle biologische Aktivität dieser Region spricht (POTTS, KRONENBERG).

Das PTH stellt eine einfache Polypeptidkette dar, ohne dass es Disulfidbrücken besitzt oder einer posttranslationalen Modifikation, wie z.B. Phosphorylierung oder Glykosylierung, unterliegt (POTTS, KRONENBERG). Verpackt in Sekretgranula gelangt es vom Golgi-Apparat zur Membran (HAMILTON et al., 1971), wo es sezerniert wird. Da das Hormon nur in geringem Umfang in den Epithelkörperchen gespeichert wird, muss es stattdessen kontinuierlich synthetisiert werden (LÖFFLER, PETRIDES, 1998). Der primäre Auslöser für eine erhöhte PTH-Sekretion ist das Absinken des Calcium-Spiegels im Blut. Umgekehrt wird die Produktion bei erhöhten Calcium-Werten gedrosselt. Dieser Vorgang geschieht mittels eines Calcium-Rezeptors, der in der Plasmamembran der



**Abb. 9:** Das Prä-Pro-PTH-Gen und die Prozessierung seines Transkriptions- und Translationsproduktes (aus: LÖFFLER, PETRIDES, 1998, S. 860)

Epithelkörperchen liegt und dort als Calcium-Sensor fungiert. Der Abbau des PTH erfolgt ebenfalls in der Nebenschilddrüse, gleichzeitig jedoch auch in peripheren Organen, wie Leber und Nieren. Zunächst erfolgt eine erste Spaltung hinter dem ersten Drittel des Moleküls, wobei ein biologisch noch voll aktives Bruchstück aus den AS 1–33 und ein inaktives Bruchstück aus den AS 34–84 entstehen. Die Bruchstücke werden anschließend von den Epithelkörperchen an das Blut weitergegeben, wo sie aufgrund ihrer höheren Halbwertszeit (HWZ) bis zu 100 mal länger zirkulieren als das intakte Hormon (POTTS, KRONENBERG) und somit ein Gemisch unterschiedlich aktiver Segmente entsteht, was die Reindarstellung des PTHs sowie die Konzentrationsmessung des Hormons erschwert (LÖFFLER, PETRIDES).

Tab. 1: Aminosäuresequenz von PTH (homologe Aminosäuren fett gedruckt) (aus: DUVOS, 1995, S. 2)

<b>Mensch</b>	E	W	L	R	K	K	L	Q	D	V	H	N	F	V	A	L	G	A	P	L	A	
<b>Ratte</b>	Q	W	L	R	K	K	L	Q	D	V	H	N	F	V	S	L	G	V	Q	M	A	
<b>Rind</b>	E	W	L	R	K	K	L	Q	D	V	H	N	F	V	A	L	G	A	S	I	A	
<b>Schwein</b>	E	W	L	R	K	K	L	Q	D	V	H	N	F	V	A	L	G	A	S	I	V	
							25														40	
<b>Mensch</b>	P	R	D	A	G	S	Q	R	P	R	K	K	E	D	N	V	L	V	E	S	H	
<b>Ratte</b>	A	R	E	G	S	Y	Q	R	P	T	K	K	E	E	N	V	L	V	D	G	N	
<b>Rind</b>	Y	R	D	G	S	S	Q	R	P	R	K	K	E	D	N	V	L	V	E	S	H	
<b>Schwein</b>	H	R	D	G	G	S	Q	R	P	R	K	K	E	D	N	V	L	V	E	S	H	
							45														60	
<b>Mensch</b>	E	K	S	L	G	E	A	D	K	A	D	V	D	V	L	T	K	A	K	S	Q	-COOH
<b>Ratte</b>	S	K	S	L	G	E	G	D	K	A	D	V	D	V	L	V	K	A	K	P	Q	-COOH
<b>Rind</b>	Q	K	S	L	G	E	A	D	K	A	D	V	D	V	L	I	K	A	K	P	Q	-COOH
<b>Schwein</b>	Q	K	S	L	G	E	A	D	K	A	A	V	D	V	L	I	K	A	K	P	Q	-COOH
							65															84

### 2.2.2 Allgemeine Wirkungen von Parathormon im Organismus

Zusammen mit den Hormonen Calcitonin, welches in den C-Zellen der Schilddrüse produziert wird, und 1,25-Dihydroxycholecalciferol, der biologisch aktiven Form des Vitamin D, ist PTH für die Konstanthaltung des Calciumspiegels im Plasma verantwortlich (LÖFFLER, PETRIDES). Dieser liegt zwischen 2,1 und 2,6 mmol/L, wovon 50% des Calciums in proteingebundener Form und 50% in ionisierter und damit aktiver Form vorliegen. Wird PTH parenteral zugeführt, so folgt ein Anstieg des Blutcalciums, während gleichzeitig der Phosphatspiegel im Blut sinkt und die Phosphatausscheidung im Urin steigt (Phosphaturie) (BUDDECKE). Diese Veränderungen lassen sich durch die Wirkung von PTH auf Nieren, Skelett und Gastrointestinaltrakt erklären und werden durch die Bindung von PTH an einen speziellen Rezeptor, dem PTH-Rezeptor, ausgelöst. Darauf folgt die Auslösung einer Reaktionskaskade über die Aktivierung der Adenylat-Zyklase und anschließendem Anstieg der intrazellulären cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

Neben den genannten drei Geweben sind PTH-Rezeptoren in einer Vielzahl weiterer Zellen nachgewiesen worden (siehe Tabelle 2). Hier ist jedoch die genaue Funktion von PTH auf diese Gewebe nicht endgültig geklärt (LÖFFLER, PETRIDES).

#### Renale Wirkung

Eine Zunahme der aktiven Sekretion von Phosphat im distalen Tubulus bei gleichzeitiger Hemmung der Rückresorption im proximalen Tubulus führt zur Phosphaturie. Die Resorption von Calcium

**Tab. 2:** Vorkommen von Rezeptoren für PTH (aus: LÖFFLER, PETRIDES, 1998, S. 862)

Gewebe	Menge
Knochen	++
Nieren	++++
Leber	++
Lunge	++
Testes	++
Brustdrüse	+
Ileum	+
Haut	+
Uterus	+
Skelettmuskel	+
Myokard	+
Ovar	+
Schilddrüse	-
Hypophyse	-
Prostata	-

im distalen Tubulus dagegen wird erhöht und kann so von 90% auf bis zu 98% gesteigert werden (POTTS, KRONENBERG). Desweiteren stimuliert PTH die Synthese der 25-Hydroxylasecholecalciferol-1 $\alpha$ -Hydroxylase, welche das 25-Hydroxycholecalciferol umwandelt zum 1,25-Dihydroxycholecalciferol, der stoffwechselaktiven Form des Vitamin D. Dies wiederum ermöglicht eine Steigerung der intestinalen Calciumresorption.

### **Gastrointestinale Wirkung**

Unter PTH-Einfluss steigt die Resorption von Calcium im Intestinaltrakt und damit die Abgabe dessen an das Blut. Dieser Effekt hat jedoch nur eine geringe Bedeutung und ist zudem Vitamin D abhängig.

### **2.2.3 Anabole Wirkung von PTH auf Knochenzellen**

Die bisher in vielen Lehrbüchern zumeist geschilderte katabole Wirkung von PTH auf den Knochen bezieht sich auf die indirekte Aktivierung der Osteoklasten und damit die Knochenresorption. Da

die Osteoklasten selbst keinen PTH-Rezeptor besitzen, wirkt das PTH indirekt über den Rezeptor der Osteoblasten, die daraufhin über das in Abschnitt 2.1.1 bereits erläuterte RANKL/RANK/OPG-System die Bildung und Aktivierung der Osteoklasten fördern (KORNAK ET AL., 2003).

Durch die Resorptionstätigkeit der Osteoklasten wird zudem TGF- $\beta$  freigesetzt, welches zuvor in der Knochenmatrix lagerte und die Osteoblasten stimuliert, vermehrt OPG und Osteoid zu bilden.

Des Weiteren produzieren die Osteoblasten Kollagenasen, die die oberste Knochenschicht auflösen, so dass anschließend der Resorptionsvorgang im Bereich der *ruffled membrane* der Osteoklasten beginnen kann.

Der Resorptionsvorgang wiederum hat durch die erhöhte Aktivität von Kollagenasen (WALKER et al, 1964) und Hydrolasen eine erhöhte Freisetzung von Hydroxyprolin (LUBEN et al, 1974) zur Folge, welches, da es im Urin ausgeschieden wird, als diagnostischer Parameter für eine erhöhte PTH-Aktivität spricht (LÖFFLER, PETRIDES). Osteozyten werden durch PTH ebenfalls zur Resorption der sie umgebenden calcifizierten Matrix angeregt.

Doch neben der katabolen Wirkung gibt es auch eine anabole Wirkung von PTH, die zuerst im Jahre 1929 von BAUER et al. vermutet wurde, indem er zeigte, dass bei Ratten nach Injektion von PTH-Extrakt das Knochencalcium erhöht war, was dann im Jahre 1932 von SELYE bestätigt werden konnte. Eine einmalige tägliche Injektion von PTH verursachte einen makroskopisch dichteren Knochen als bei unbehandelten Ratten. Wurde das Hormon allerdings in höheren Dosen verabreicht, so war Knochenresorption das Resultat (SELYE, 1932).

Ab 1970 folgten Versuche zur anabolen Wirkung von PTH vor allem an Ratten, aber auch an Hunden, Primaten und Menschen. Hierbei zeigte sich auch, dass die intermittierende Gabe von PTH eine Erhöhung sowohl der Knochendichte als auch der Knochenmasse verursachte, dies jedoch stärker im Bereich der Spongiosa als in der Kompakta (GUENESS-HEY, HOCK, 1984). 1977 konnten KIM et al. schließlich zeigen, dass durch PTH die mechanische Festigkeit einer Fraktur bei ovariectomisierten Ratten erhöht werden konnte, was durch ANDREASSEN et al. 1999 erstmals auch an stoffwechselgesunden Ratten gezeigt werden konnte.

Der genaue Mechanismus der anabolen Wirkung von PTH ist zwar noch nicht vollständig geklärt, fest steht jedoch, dass durch eine intermittierende Gabe von PTH nicht nur die Zahl der Osteoblasten, sondern auch deren Aktivität erhöht wird (DOBNIG, TURNER, 1995). Nach NISHIDA et al (1994) induziert PTH die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen, während DOBNIG und TURNER (1995) mittels radioaktiv markiertem [ $^3H$ ]-Thymidin demonstrierten, dass



der PTH-Effekt über eine Aktivierung von bereits vorhandenen Bone Lining Cells, die sich zu Osteoblasten differenzieren, zustande kommt und dementsprechend von der Zahl der Bone Lining Cells abhängig ist (QI et al, 1994).

PTH bindet an einen eigenen Rezeptor auf der Oberfläche der Osteoblasten und initiiert vermutlich sowohl über das cAMP/Proteinkinase (PK) A-System als auch über das  $\text{Ca}^{++}$ /PK C-System eine Stimulation der Osteoblastendifferenzierung (ISHIZUYA, 1997).

Sogenannte *Immediate Early Genes* (IEG), z.B. c-fos, c-jun und c-myc, sowie Interleukin (IL)-6-mRNA werden bereits nach einer einmaligen Gabe von 80  $\mu\text{gPTH/kgKG}$  vermehrt exprimiert und fördern so die Zelldifferenzierung, während die Zellproliferation gleichzeitig gesenkt wird (ONYIA, 1995; BERTOLINI, 1994; HOLT, 1994). Auch Wachstumsfaktoren, wie der Transforming Growth Factor (TGF) und Insulin-like Growth Factor 1, spielen eine wichtige Rolle in der anabolen PTH-Wirkung. PTH induziert sowohl eine verstärkte IGF-1-Synthese (CANALIS, CENTRELLA, 1989) als auch die der IGF-bindenden Proteine (IGF-BP) 3,4 und 5. IGF-BP 4 gilt als Inhibitor für IGF-1, was eine mögliche Erklärung für die katabole Wirkung bei kontinuierlicher PTH-Gabe darstellen könnte (WATSON ET AL., 1999).

Ob nach PTH-Gabe eine katabole oder anabole Reaktion erfolgt, ist zeit- und dosisabhängig.

### 2.3 Osseointegration

In den 1970ern wurde von BRÄNEMARK der Begriff der Osseointegration geprägt, welcher eine chemische Bindung zwischen Implantat und Knochen implizierte. Heute versteht man unter diesem Begriff das Nichtvorhandensein einer lichtmikroskopisch nachweisbaren fibrösen Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Knochen (SKRIPITZ/ASPENBERG, 1998). Bereits 1996 berichteten YAN ET AL. über die positiven Eigenschaften von Titaniumimplantaten, die zuvor 4 Stunden mit 4 M NaOH behandelt und anschließend bei 600°C für eine Stunde erhitzt wurden. Das dadurch entstehende Titanium-Gel besitzt mehr  $\text{OH}^-$ -Gruppen (LI ET AL., 1994; KITSUGI ET AL., 1996), die wiederum die Bildung von Hydroxylapatit induzieren. Experimente an Ratten mittels eines sog. *Pull-away-plates* durch SKRIPITZ und ASPENBERG (1998) konnten dies bestätigen, was für eine klinische Anwendung dieser Implantat-Vorbehandlung aufgrund der dadurch verbesserten Osseointegration spricht.

Auch PTH wirkt sich positiv auf die Knochenheilung und somit auf die Implantatfixation aus. Die intermittierende Hormongabe führt zu einer Stimulation der Osteoblastenproliferation sowie

zu einer erhöhten Aktivität dieser. Nach NISHIDA ET AL., 1994 bewirkt PTH zudem die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen und zählt somit zu den osteogenetischen Substanzen.

### **Epidemiologische Zusammenhänge**

Klinische Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Implantatlockerung und

- demographischen sowie physiologischen Variablen (Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Aktivität, Indikationsdiagnose, Hüftdysplasie, Weite des Femoralkanals, frühere Hüftoperationen)
- der Operationstechnik
- dem Prothesendesign (Größe, Stiellänge der femoralen Komponente etc.)
- der Positionierung (Varus/Valgus Stellung)
- der Primärstabilität (RYD ET AL., 1995).

## **2.4 Implantatverankerung**

Der Erfolg eines Implantates ist also entscheidend abhängig von der Primärfixation und damit von der Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen. Bisherige Lösungsansätze versuchten beispielsweise sowohl die biomechanischen (Prothesensteifigkeit,  $E \cdot I_x$ ) als auch die werkstoffbedingten Einflussgrößen (Biokompatibilität) ausreichend zu berücksichtigen. Zur Verbesserung der Knochenheilung und damit der Implantatintegration gibt es 3 verschiedene Möglichkeiten:

### **1. Osteokonduktion**

Osteokonduktive Materialien dienen als passives Gerüst, welches die Knochenformation verbessert und unterstützt. Hierzu gehören:

- Knochentransplantate
- $\text{Ca}^{++}$ -Phosphat-Beschichtungen
- Kollagen
- Polymere, Bioglas, einige Metalle

Die Einwanderung von fibrovaskulärem Gewebe in eine poröse Struktur oder entlang einer Oberfläche führt anschließend zur Knochenneubildung (KIENAPFEL, 1992; WANG, 1993).

### 2. Osteogenese

Hierunter versteht man die Stimulation lokaler Knochenformation durch zugeführte Zellen, z.B. in Form von:

- autologem Knochenmark
- autologen Knochentransplantaten

Zudem sollen Implantatbeschichtungen aus  $\text{Ca}^{++}$ -Phosphat osteogene Effekte bewirken (TETI ET AL., 1991).

### 3. Osteoinduktion

Osteoinduktion bedeutet Mitosestimulation in perivaskulären Zellen, worauf diese sich zu Chondrozyten, Osteoprogenitorzellen oder Osteoblasten differenzieren. Mittels Rekrutierung mesenchymaler Zellen ist eine extraskelletale Knochenformation ohne die Anwesenheit von osteogenen oder osteokonduktiven Substanzen möglich. So können z.B. die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), die zur Familie der *Transforming Growth Factors* (TGF)  $\beta$  gehören, Stammzellen dahingehend stimulieren, dass diese sich zu Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren. Die Verbesserung des Knocheneinwachsverhaltens und der mechanischen Fixation von Implantaten wird vor allem erreicht durch

- BMP-2
- BMP-7
- TGF- $\beta$

(SUMMER ET AL., 1995; COOK, KRUEGER, 1996; LIND ET AL., 1996).

### 3 Material und Methoden

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde vollständig in der Universitätsklinik Eppendorf durchgeführt.

#### 3.1 Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht

Für den vorliegenden Versuch wählten wir 40 männliche Ratten der Rasse Wistar. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn ca. 8 Wochen alt und wogen zwischen 290 g und 450 g. Die Elterntiere stammten von Charles River Deutschland, Sulfeld.

#### 3.2 Genehmigung des Tierversuchs

Der Tierversuch wurde vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz mit Schreiben vom 28.11.2002 unter dem Aktenzeichen 66/02 genehmigt.

#### 3.3 Tierhaltung und Ernährung

Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 19 – 21 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Jeweils zwei Ratten teilten sich einen Makrolonkäfig Typ IV (1800 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter, das aus einer Standarddiät mit einem Calcium-Gehalt von 1,10% bestand.

#### 3.4 Versuchsaufbau

Die 40 Tiere wurden eingeteilt in eine 2-Wochen- und eine 4-Wochen-Gruppe, die wiederum aus Experiment-Gruppe und Kontroll-Gruppe bestanden, und bekamen in Narkose je einen Metallstab in die rechte und einen Zementstab in die linke Tibia implantiert.

Gewichtsadaptierend wurde den Ratten der Experiment-Gruppe ein Parathormon-Serum-Gemisch (60 µg/kg KG) bzw. der Kontrollgruppe ein NaCl-Serum-Gemisch 3x wöchentlich in der Zeit von

**Tab. 3:** Gruppeneinteilung der Tiere

	2-Wochengruppe	4-Wochengruppe
Experimentgruppe	10 Tiere	10 Tiere
Kontrollgruppe	10 Tiere	10 Tiere

8.00 bis 10.00 Uhr subkutan gespritzt. Das wöchentliche Wiegen diente zur Anpassung der Dosis und zur späteren Beurteilung eines möglichen Einflusses von PTH auf das Körpergewicht der Ratten.

### 3.5 Geräte

- GFL Wasserbad Typ 1002
- Zentrifuge, Hettich Universal, Tuttlingen
- Makrolonkäfige Typ IV mit erhöhtem Gitter, 1800 cm<sup>2</sup> Bodenfläche
- Raster-Elektronenmikroskop Tesla/Brünn BS 343
- Mikrotom
- Jenaval Lichtmikroskop
- Lichtmikroskop Neo-Phot 32, Carl-Zeiss, Jena
- Schermaschine
- Ohrlocher
- 2 mm-Handbohrer

### 3.6 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bachem, Heidelberg:	PTH (1-34) human
Braun Melsungen AG:	NaCl, 0,9%
Büsing & Fasch GmbH & Co:	Formaldehyd 3,5% wässrige Lösung gepuffert nach Lillie
Pfizer GmbH, Karlsruhe:	Carprofen (Rimadyl®)
Pharmacia & Upjohn:	Ketamin

### 3.7 Herstellung der Injektionslösungen

---

Bayer:	Xylazinhydrochlorid (Rompun®), 2% Enrofloxacin (Baytril ® 2,5%)
Selbst hergestellt:	Rattenserum, inaktiviert
Schweden:	Metall-Implante aus rostfreiem Stahl
Coripharm GmbH & CO KG:	Zement-Implantate aus PMMA-Zement
ssniff ®Spezialdiäten GmbH, Soest:	ssniff® R/M-H extrudiert, Alleindiät für Ratten- und Mäuse-Haltung
Hirschmann:	Pipetus-akku
Biohit:	Proline Pipetten, 50-200 µl / 0,5-10 µl Eppendorfer-Gefäße Spritzen, Kanülen, Skalpell
Ethicon:	Nahtmaterial
Falcon:	Biopsie-Behälter, Serologische Pipetten, 25 ml, steril

### 3.7 Herstellung der Injektionslösungen

Mittels eines Serumröhrchens abgenommenes Rattenblut wird zentrifugiert und das Serum durch anschließende einstündige Inkubation im 56 °C heißen Wasserbad inaktiviert.

#### **Kontrollgruppen-Lösung (2%iges Serum):**

16,334 ml NaCl 0,9%

0,333 ml Rattenserum, inaktiviert

#### **Experimentgruppen-Lösung:**

16,334 ml NaCl 0,9%

0,333 ml Rattenserum, inaktiviert

2 mg PTH human (entspricht 120 µg PTH/ml)

## 3.8 Implantate

### 3.8.1 Herstellung der Implantate

Hierzu wurde Palacos® zunächst bei einer Raumtemperatur von 23 °C angemischt und anschließend in Teflonformen eingebracht. Nach einer Aushärtungszeit von 12-15 Minuten wurden die 2x5 mm großen Probekörper aus der Form entnommen, in PE/Papiertüten verpackt und mittels Ethylenoxid sterilisiert.

Die Metallstäbe wurden aus handelsüblichem 2 mm Kirschnerdrähten angefertigt.

## 3.9 Implantation der Metall- und Zementstäbe

### 3.9.1 Narkose und Operationsvorbereitungen

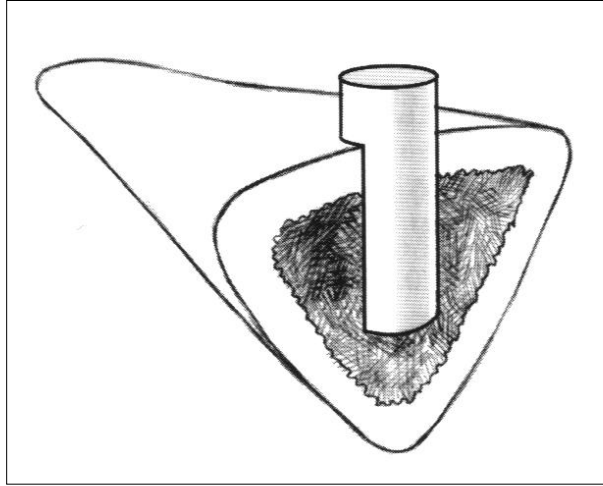
Die Ratten wurden zunächst mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation sediert, um die anschließende Injektionsnarkose zu erleichtern. Letztere erfolgte durch ein Ketamin (12 mg/ml)-Xylazin (1,6 mg/ml)-Gemisch in einer Dosierung von 5 mg/kg KG intraperitoneal. Zur Analgesie diente Carprofen (Rimadyl®) subkutan in einer Dosierung von 4 mg/kg KG, während die perioperative Infektionsprophylaxe mit Enrofloxacin 2,5% (Baytril®), 5 mg/kg KG durchgeführt wurde. Zur Vorbereitung auf die Operation wurden beide hinteren Extremitäten komplett geschoren und das Tier anschließend mit den Füßen zuerst in einen sterilen OP-Handschuh gegeben. Durch zwei Einschnitte in den Handschuh auf Höhe der Kniegelenke wurden die Hinterbeine anschließend herausgezogen, die Füße mit steriler Klebefolie umwickelt und das Operationsgebiet mit einem jodhaltigen Antiseptikum desinfiziert.

### 3.9.2 Operationstechnik

Zunächst erfolgt ein longitudinaler Hautschnitt an der medialen Tibiakante. Das darunterliegende Periost wird mit dem Skalpell abgeschabt, so dass die anschließende Bohrung mit Hilfe einer Kanüle erleichtert wird. Das Bohrloch wird mittels eines Nagels und eines 2 mm-Handbohrers geweitet, die Implantate eingesetzt und die Wunde zugenäht (siehe Abb. 10, 11 und 12).

### 3.9.3 Postoperatives Verfahren

Nach OP-Ende kamen je zwei Tiere in einen gemeinsamen Käfig und wurden für 2 bzw. 4 Wochen in der unter 3.3 beschriebenen Tierhaltung gehalten. Zur Infektionsprophylaxe wurde Enrofloxacin 10 %, 2 ml/L ins Trinkwasser gegeben.



**Abb. 10:** Tibia (Quer) mit Implantat (Schema)



**Abb. 11:** OP-Material





**Abb. 12:** Implantation des Metallstabs



**Abb. 13:** Tibia mit PMMA-Stab



**Abb. 14:** Tibia mit Metallstab

#### **3.9.4 Implantat-Entnahme**

Die Ratten werden unter einer Glasglocke durch Einleitung von Kohlendioxid getötet. Anschließend wird die Tibia im Knie- sowie im Sprunggelenk gebrochen und nach Entfernung der Weichteile inklusive der Implantate entnommen. Zusätzlich wurde jeweils der rechte Femur entnommen (siehe Abb. 13, 14 und 15).

#### **3.10 Histologische Untersuchung**

Sämtliche Arbeitsschritte der histologischen Untersuchung wurden im Universitätskrankenhaus Linköping durchgeführt.



**Abb. 15:** Femur

### 3.10.1 Anfertigung der Paraffinschnitte

#### *I. Fixation*

Die entnommenen Knochen wurden in eine 4%ige gepufferte Formalinlösung eingelegt und an das Universitätskrankenhaus in Linköping, Schweden geschickt. Dort erfolgten alle weiteren Schritte der histologischen Bearbeitung sowie die histomorphometrische Auswertung.

#### *II. Trimmen der Explantate und Decalcification*

Die fixierten Tibiae wurden zunächst auf eine entsprechende Größe zugeschnitten und anschließend in eine 10 %ige EDTA-Lösung für 4 Wochen eingelegt. Die Lösung wurde dabei 1–2 mal pro Woche gewechselt.

#### *III. Dehydratation*

Die nach Fixierung und Trimmung erhaltenen Probestücke wurden anschließend zur Dehydratation in eine aufsteigende Ethanolreihe gemäß dem Schema in Tabelle 4 gegeben.

#### *IV. Auswaschung*

**Tab. 4:** Dehydratationsschritte

Schritt	Alkoholgehalt	Dauer	Anzahl der Wiederholungen
1.	70%	30–60 Min.	2
2.	95%	2 Std.	2
3.	99,50%	3–4 Std.	3

Nach der Dehydratation erfolgt eine 3fache Auswaschung mit Xylen für jeweils 3–4 Stunden.

#### *V. Infiltration*

Zur Infiltration werden die Präparate 2–3 mal für jeweils mindestens 3 Stunden in Paraffin eingebettet.

#### *VI. Anfertigung der Sägeschliffblöcke*

Nach der Anfertigung der Sägeblöcke, anschließendem Schleifen und Polieren wurden Schnitte einer Schichtdicke von 6  $\mu$  hergestellt und in ein heißes Wasserbad gegeben. Danach werden sie mittels einer Pinzette auf einen Objektträger gegeben und bei 45 °C für 12 Stunden im Ofen nochmals fixiert.

### **3.10.2 Histologische Färbung**

Die Färbung der Präparate erfolgte nach der Erlich-Haematoxylin-Eosin-Färbung (H.E.):

1. De-Paraffinasation:
  - a) Xylen (2x 10 Min)
  - b) Alkohol abs. (5 Min)
  - c) Alkohol 95 % (3 Min)
  - d) aqua dest. (10 Min)
2. Erlich Haematoxylin (10 Min)
3. Abspülen unter fließendem Wasser (5 Min)
4. HCL-Alkohol-diff.
5. Spülen (5 Min)
6. Eosin (3-5 Min)
7. Alkohol 96 % (3 Waschungen)
8. Alkohol abs. (2 Min)
9. Xylol (3 Min)

### 3.10.3 Herstellung der Haematoxylin-Färbung

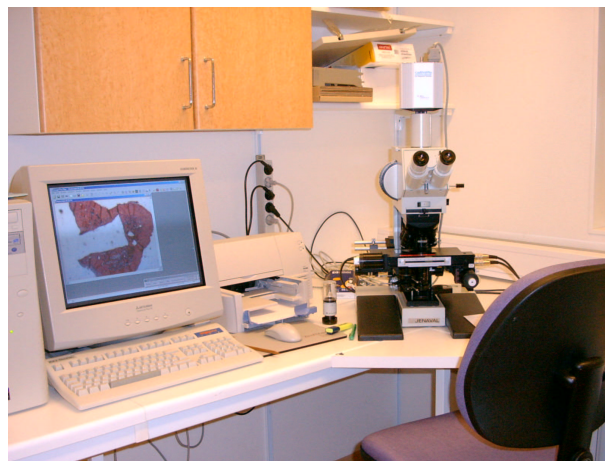
2 g Haematoxylin werden gelöst in 100 ml 96 %igem Alkohol, und anschließend erfolgt die Zugabe von

1. aqua dest. 100 ml
2. Glyzerin 100 ml
3. Kaliumaluminiumsulfat 3 g
4. Essigsäure 10 ml

Abschließend muss die Lösung für einige Monate „reifen“ bzw. nach Zugabe von 0,2 g  $\text{NaJO}_3$  pro Gramm Haematoxylin nur einen Tag.

### 3.11 Histomorphometrische Auswertung der Ergebnisse

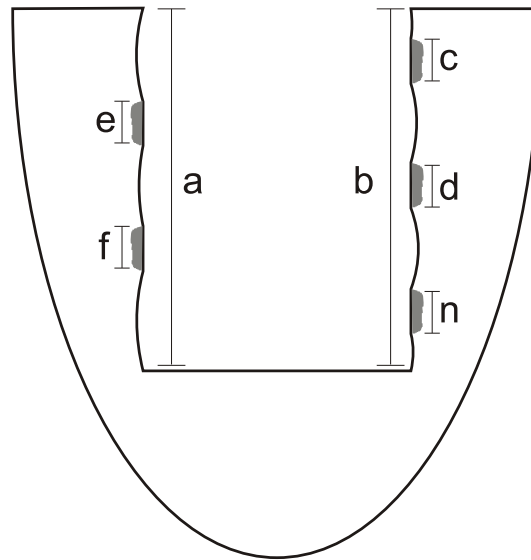
Die histomorphometrische Auswertung der Tibiae sowie der Femure erfolgte mit Hilfe eines Jenaval Lichtmikroskops (siehe Abb. 16) mit integrierter Digitalkamera (Cool SNAP,  $1390 \times 1040$  Pixel) und der Image Analysis Software (Image Pro Plus Programm 4.1, Media Cybernetics, USA).



**Abb. 16:** Arbeitsplatz

#### 3.11.1 Implantat-Knochen-Kontakt

Um den prozentualen Knochenkontaktanteil der Implantate zu ermitteln, wurden zunächst die Gesamtlängen  $a$  und  $b$  der Implantationstiefe computergestützt durch Markierung des Anfangs-



**Abb. 17:** Messung des Implantat-Knochenkontakts, Schema (grau = direkter Knochenkontakt)

und Endpunktes ausgemessen. Anschließend wurden die Teilstrecken  $c - n$ , die einen direkten Kontakt zwischen Implantat und Knochen aufwiesen, d.h. ohne fibröses Bindegewebe dazwischen, ermittelt, danach addiert und ins Verhältnis zur Gesamtstrecke gesetzt (Abbildung 17).

### 3.11.2 Knochendichtebestimmung

Die Dichte der Spongiosa wurde mit einem speziellen Integrationsokular, dem Merz-Grid, ermittelt, welches in Abbildung 18 schematisch dargestellt ist.  $F$  ist die Anzahl der ausgemessenen Merz-Grid-Felder und somit gleich 1 bei der Ermittlung der Knochendichte der Tibiae.  $P$  stellt die Anzahl von 36 möglichen Schnittpunkten, die in kortikalen Knochen liegen, dar.  $N$  dagegen repräsentiert die Anzahl der Schnittpunkte mit Cortikalisoberfläche. Die Merz-Grid-Konstante  $d$  ist abhängig von der jeweiligen Vergrößerung und beträgt bei einer Vergrößerung von  $50 \times 1,25$  0,03 mm. Es wurde eine Vergrößerung von  $50 \times 1,25$  gewählt, damit das Merz-Grid eine möglichst große Fläche des Tibiaquerschnitts (periimplantär). Zur Ermittlung der Femur-Knochendichte wurden jeweils 6 Merz-Grid-Felder ( $F = 6$ ) ausgezählt. Das Merz-Grid wurde hierbei so auf den Femur-Querschnitt projiziert, dass es möglichst den gesamten Querschnitt einnahm.

Zur Erfassung der Strukturmerkmale wurden verschiedene, auf Volumen- und Oberflächenmessungen basierende Kriterien herangezogen. Die wichtigsten Parameter und Messresultate sind:

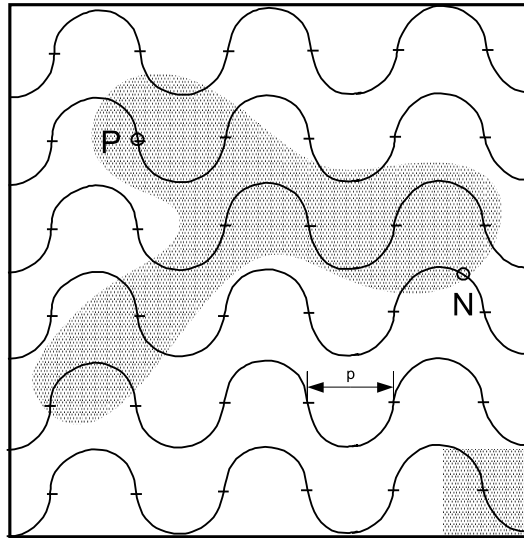


Abb. 18: Merz-Grid 3600x3600 µm

### 1. Volumetrische Dichte der Spongiosa $V_v$

Die volumetrische Dichte der Spongiosa  $V_v$  [%] stellt den prozentualen Anteil der knöchernen Interzellularsubstanz am Gesamtvolumen dar.  $V_v$  nimmt mit zunehmendem Alter stetig ab und führt somit schrittweise zu niedrigeren Werten, wie sie für die senile Atrophie charakteristisch sind.

$$V_v = \frac{P \cdot 100}{F \cdot 36} \%$$

### 2. Oberflächendichte $S_v$

Die Oberflächendichte  $S_v$ , ([mm<sup>2</sup>Trabekeloberfläche/cm<sup>3</sup>Gesamtvolumen]) wird v.a. benötigt, um die in Prozenten der Trabekeloberfläche berechneten Umbaudaten in absolute Werte innerhalb eines Einheitsvolumens (mm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>) umzuwandeln. Auch sie zeigt typische Altersveränderungen wie die Volumetrische Dichte.

$$S_v \text{ [mm}^2\text{/cm}^3\text{]} = \frac{N}{F} \cdot ksv \quad ksv \text{ [mm}^2\text{/cm}^3\text{]} = \frac{4 \cdot 10^3}{\pi \cdot 36 \cdot d} = \frac{10^3}{9\pi \cdot d}$$

### 3. Spezifische Oberfläche $S/V$

Die spezifische Oberfläche  $S/V$ , ([mm<sup>2</sup>Trabekeloberfläche/mm<sup>3</sup>Trabekeleigenvolumen]) ist reziprok zum mittleren Bälkchendurchmesser und bleibt im Mittel durch alle Altersgruppen hindurch konstant. Die starke Zunahme der Streuung ist auf eine Aufspaltung in zwei unterschiedliche statistische Populationen zurückzuführen. Eine davon zeigt einen Substanzverlust in  $V_v$ , der immer von

einer harmonischen Verkleinerung des mittleren Bälkchendurchmessers begleitet wird, aber nicht zu einer Veränderung der Gerüstanordnung führt. In der anderen Population wiederum ist die Zahl der Bälkchen reduziert, die übrig gebliebenen Trabekel sind anders orientiert und weisen eine beträchtliche Dickenzunahme auf. Möglicherweise stellen diese strukturellen Veränderungen eine physiologische Reaktion von atrophierendem Knochen auf eine drohende Insuffizienz dar.

$$\frac{S}{V} = \frac{N}{P} \cdot ksv \quad ksv \text{ [mm}^2\text{/mm}^3\text{]} = \frac{4}{\pi \cdot d}$$

### 3.12 Roughnessmessung

Die Roughnessmessung erfolgte an der Hochschule Görlitz/Zittau. Zur Ermittlung der Oberflächenrauigkeit (Roughness) wurden die Implantate im sogenannten Tastschnittverfahren mittels einer mikroskopisch feinen Nadel abgefahren. Anhand der Ausschläge eines Schreibers wurde so das Oberflächenprofil ermittelt.

### 3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Statistiksoftware (StatView), mit der ANOVA-Tabellen (Tabellen 8 und 9), Mittelwert, Standardabweichungen sowie die in den Ergebnissen dargestellten Balkendiagramme erstellt wurden. Die Balkendiagramme (Abbildungen 25, 26, 27, 37 und 38) zeigen die Ergebnisse der PTH-Gruppen in dunkelgrau dargestellt, die der Kontrollgruppe in hellgrau, jeweils mit Standardabweichung.

Des weiteren wurde die Roughness des PMMA- und Metallimplantats elektronenmikroskopisch ermittelt.



## 4 Ergebnisse

Sechs Ratten mussten aus der Studie ausgeschlossen werden. Zwei davon verstarben noch während der Narkose, während bei weiteren vier Ratten der PMMA- bzw. der Metallstab postoperativ dislozierte. Bei den übrigen Tieren verliefen Implantation und postoperativer Verlauf jedoch komplikationslos. Die Nähte zeigten sich reizlos und ohne jegliche Zeichen einer Wundinfektion wie z.B. Rötung, Schwellung, etc.

### 4.1 Der Einfluss von Parathormon auf das Körpergewicht

Nach 2 Wochen zeigte sich in der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 68,44 g, entsprechend 18,73 % bezogen auf das Ausgangsgewicht. In der PTH-Gruppe konnte nach 2 Wochen eine Gewichtszunahme von 64,33 g, entsprechend 18,45 % verzeichnet werden. Somit ist der Zuwachs nach 2 Wochen in der Kontroll- und der PTH-Gruppe nahezu identisch. Auch nach 4 Wochen konnte kein positiver Einfluss von Parathormon auf das Körpergewicht festgestellt werden. Die Tiere der Kontrollgruppe waren mit einer Gewichtszunahme von 35,2 % (139,0 g) sogar etwas schwerer als die PTH-behandelten Ratten mit einem durchschnittlichen Zuwachs von 113,4 g (29,78 %) (siehe Tabelle 5 und Abbildungen 19 bis 22).

### 4.2 Roughness Auswertung

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Ergebnisse der Roughness-Auswertung. Im Elektronenmikroskop ist der Unterschied der Oberflächenrauigkeit der beiden Werkstoffe PMMA und Edelstahl deutlich sichtbar. Während sich für Stahl ein Mittenrauhwert von  $R_a = 0,116 \mu\text{m}$  ergab, zeigte PMMA mit  $R_a = 2,06 \mu\text{m}$  eine knapp 18fache Oberflächenrauigkeit. Letzteres stellt somit bessere Bedingungen für das Knochenimplantationsverhalten dar.

**Tab. 5:** Durchschnittliche Gewichtszunahme der Kontroll- und PTH-Gruppe im Vergleich

	Gewichtszunahme [g]	Gewichtszunahme [%]
<b>Kontrollgruppe 2 Wochen</b>	68,44	18,73
<b>PTH-Gruppe 2 Wochen</b>	64,33	18,45
<b>Kontrollgruppe 4 Wochen</b>	139,0	35,2
<b>PTH-Gruppe 4 Wochen</b>	113,4	29,78

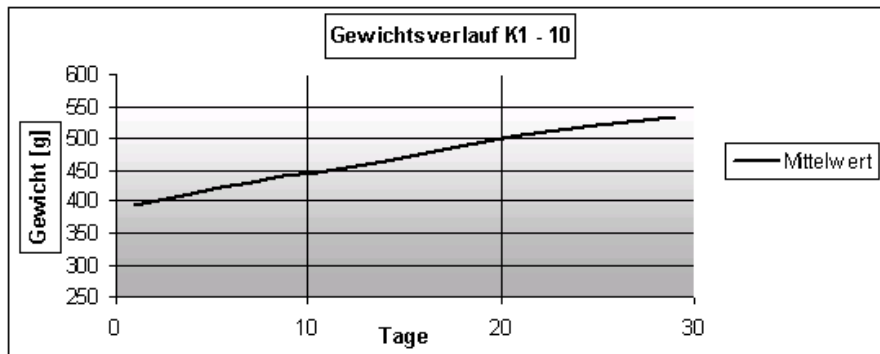


Abb. 19: Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe, 2 Wochen

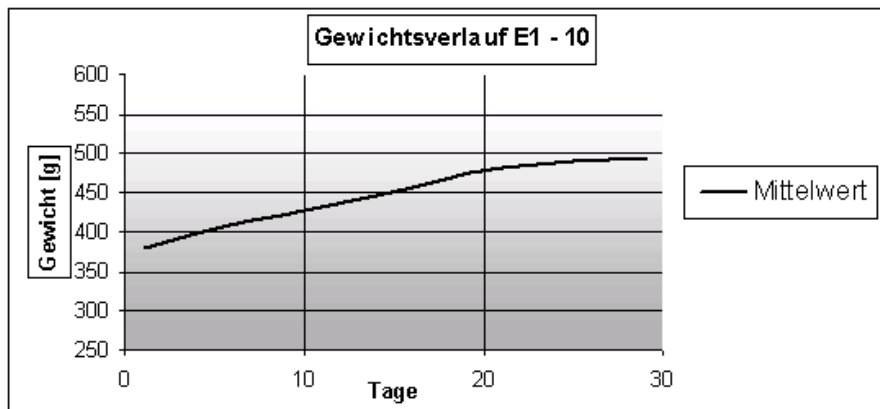


Abb. 20: Gewichtsverlauf der PTH-Gruppe, 2 Wochen

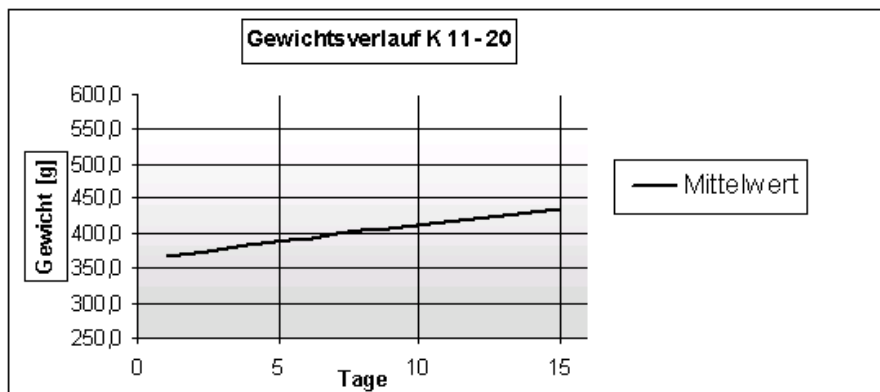
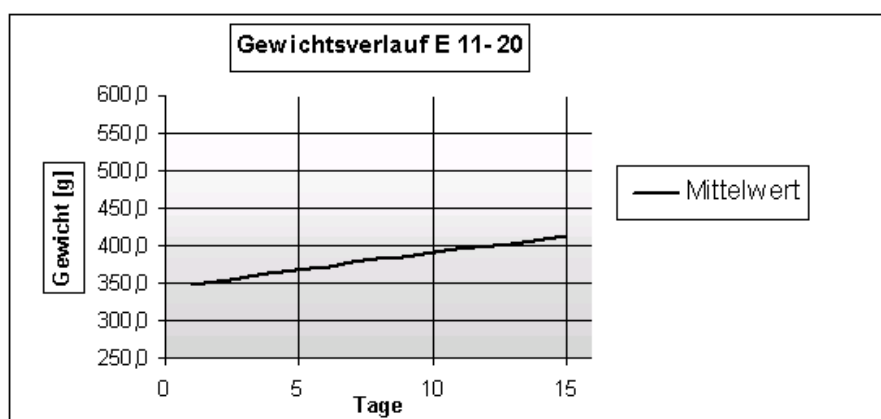


Abb. 21: Gewichtsverlauf der Kontrollgruppe, 4 Wochen



**Abb. 22:** Gewichtsverlauf der PTH-Gruppe, 4 Wochen

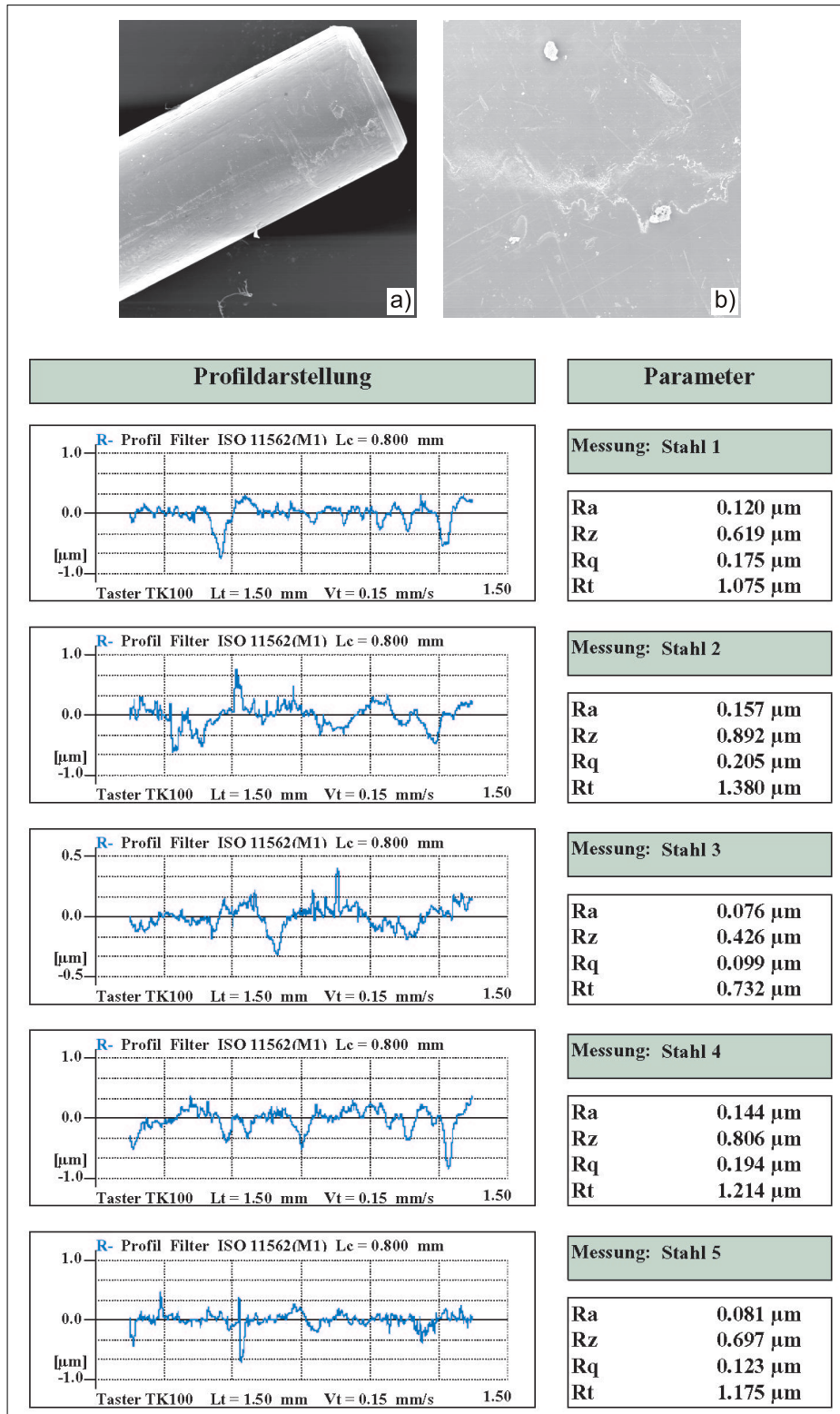
**Tab. 6:** Knochenkontaktanteil (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Behandlungsgruppe	Knochenkontaktanteil (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	
	PMMA	Edelstahl
PTH - 2 Wochen	53,56 ( $\pm$ 26,32)	21,1 ( $\pm$ 10,8)
Kontrolle - 2 Wochen	7,9 ( $\pm$ 10,3)	7,4 ( $\pm$ 7,7)
PTH - 4 Wochen	65,6 ( $\pm$ 15,73)	47,1 ( $\pm$ 13,3)
Kontrolle - 4 Wochen	14,3 ( $\pm$ 15,0)	9,8 ( $\pm$ 8,2)

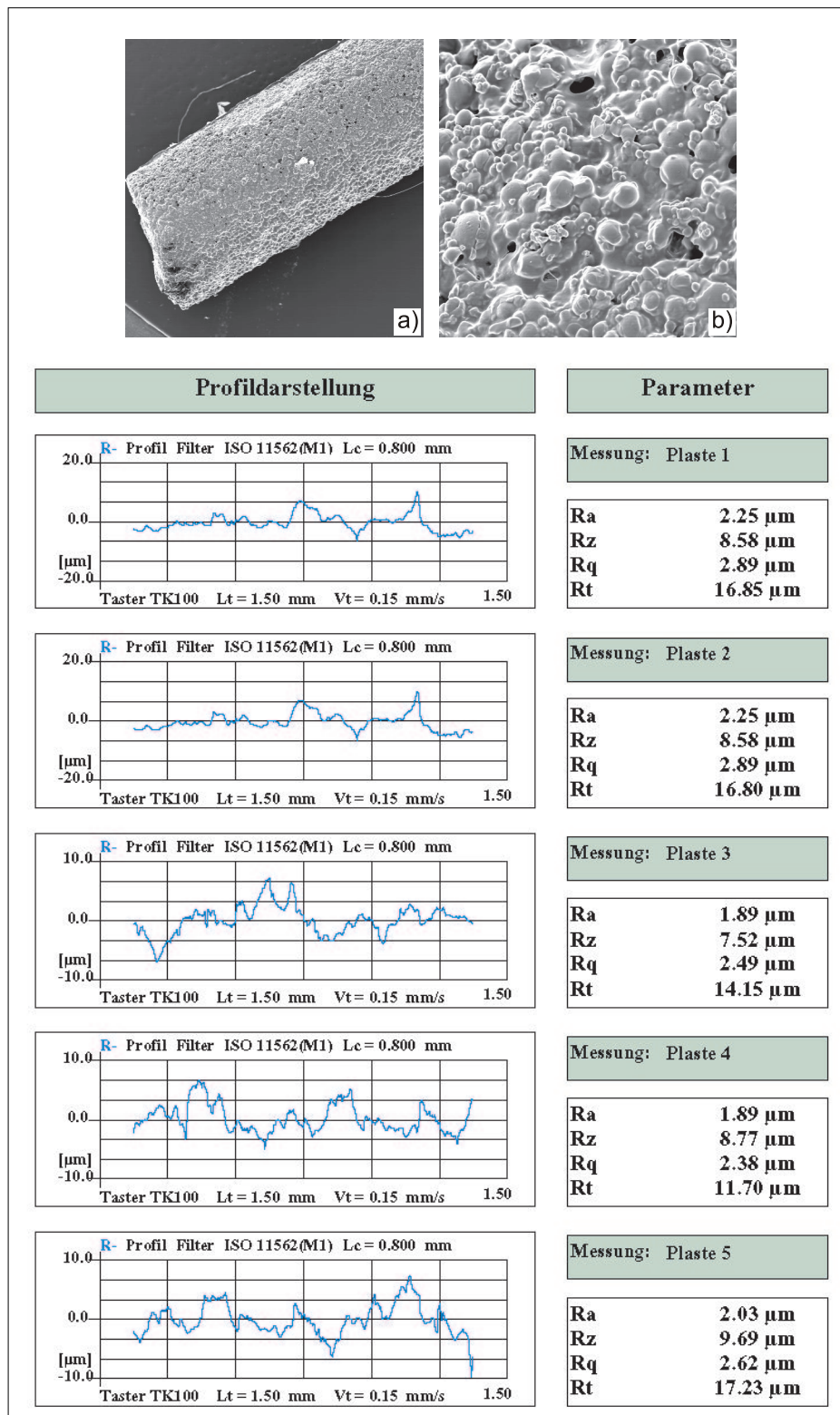
### 4.3 Implantat-Knochen-Kontakt

Die Auswertung der Histomorphometrie mittels ANOVA-Tabelle und Fisher-PLSD-Test mit einem Signifikanzlevel von 0,05 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der PTH- und der Kontrollgruppe, sowohl in der 2- wie auch in der 4-Wochen-Gruppe (Tab. 6). Bereits nach 2 Wochen hatte der PMMA-Stab der PTH-Gruppe mit 53,56 % Knochenkontaktanteil eine 6,8fach höhere Kontaktfläche als der der Kontrollgruppe mit lediglich 7,9 % Knochenkontaktanteil. Nach 4 Wochen betrug der Unterschied zwischen prozentualem Knochenkontaktanteil der PTH-Gruppe mit 65,6 % und dem der Kontrollgruppe mit 14,3 % noch das 4,6-fache. Beim Metallstab betrug die Unterschiede zwischen PTH- und Kontrollgruppe nach 2 Wochen das 2,9fache (21,1 % in der PTH-Gruppe gegenüber 7,4 % in der Kontrollgruppe) und nach 4 Wochen das 4,8fache (47,1 % in der PTH-Gruppe gegenüber 9,8 % in der Kontrollgruppe) (Tabelle 6).

Die Ergebnisse des PMMA-Knochen-Kontakts in Bezug auf die Behandlungsart (PTH oder



**Abb. 23:** Edelstahl-Implantat, E-Mikroskop: **a:** 60fache Vergrößerung, **b:** 600fache Vergrößerung, **unten:** Roughness-Messung



**Abb. 24:** PMMA-Implantat, E-Mikroskop: **a:** 60fache Vergrößerung, **b:** 600fache Vergrößerung, **unten:** Roughness-Messung

**Tab. 7:** Seitenvergleich PMMA/Edelstahl (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Gruppe	Behandlungsdauer	n	Knochenkontakt in % (SD)
			Differenz PMMA–Stahl
PTH	2 Wochen	9	32,45 ( $\pm$ 27,42)
Kontrolle	2 Wochen	5	7,32 ( $\pm$ 14,27)
PTH	4 Wochen	7	22,76 ( $\pm$ 19,56)
Kontrolle	4 Wochen	9	4,51 ( $\pm$ 16,60)

**Tab. 8:** ANOVA-Tabelle, PMMA-Knochenkontakt

	P-Wert	Lambda	Power
<b>Behandlungsdauer</b>	0,1564	2,117	0,276
<b>Behandlung</b>	< 0,0001	58,134	1
<b>Dauer · Behandlung</b>	0,6621	0,195	0,071

Kontrolllösung) waren signifikant ( $p < 0,0001$ ), es bestand jedoch keine Signifikanz bezüglich der gewählten Behandlungsdauer. Die Ergebnisse des Stahl-Knochen-Kontakts waren sowohl in Bezug auf die Behandlungsart ( $p < 0,0001$ ) als auch hinsichtlich der Behandlungsdauer (2 oder 4 Wochen) ( $p = 0,0003$ ) sowie der Kombination aus Behandlungsdauer und -art signifikant ( $p = 0,002$ ).

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen den deutlichen Unterschied des prozentualen Implantat-Knochenkontaktanteils zwischen Kontroll- und PTH-Gruppe in der graphischen Darstellung.

Während in der PTH-Gruppe der direkte Knochenkontakt zum Implantat mikroskopisch deutlich zu sehen war, zeigte sich in den Kontrollgruppen häufig eine fibröse Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Knochen, die nach ASPENBERG und VAN DER VIS (1998) auch für eine spätere Prothesenlockerung verantwortlich sein könnte. Die folgenden Abbildungen zeigen die histologischen Querschnitte der Tibiae im Bereich der PMMA- bzw. Stahlimplantate jeweils im Vergleich

**Tab. 9:** ANOVA-Tabelle, Stahl-Knochenkontakt

	P-Wert	Lambda	Power
<b>Behandlungsdauer</b>	0,0003	16,45	0,985
<b>Behandlung</b>	< 0,0001	52,937	1
<b>Dauer · Behandlung</b>	0,0021	11,284	0,919

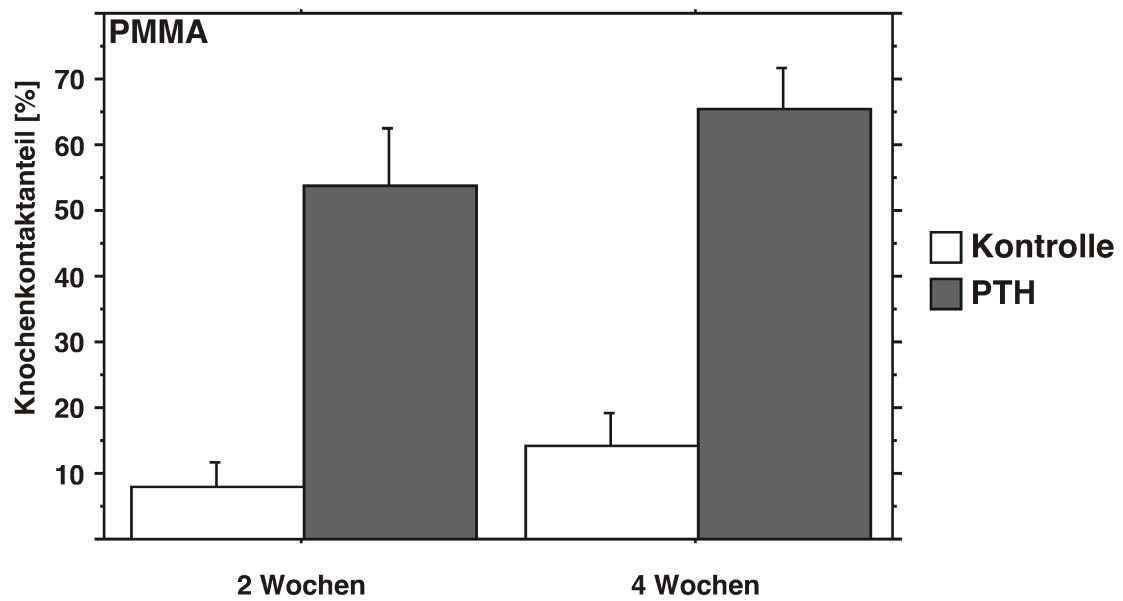


Abb. 25: Knochenkontaktanteil in % ( $\pm$  Standardabweichung) bei den PMMA-Implantaten

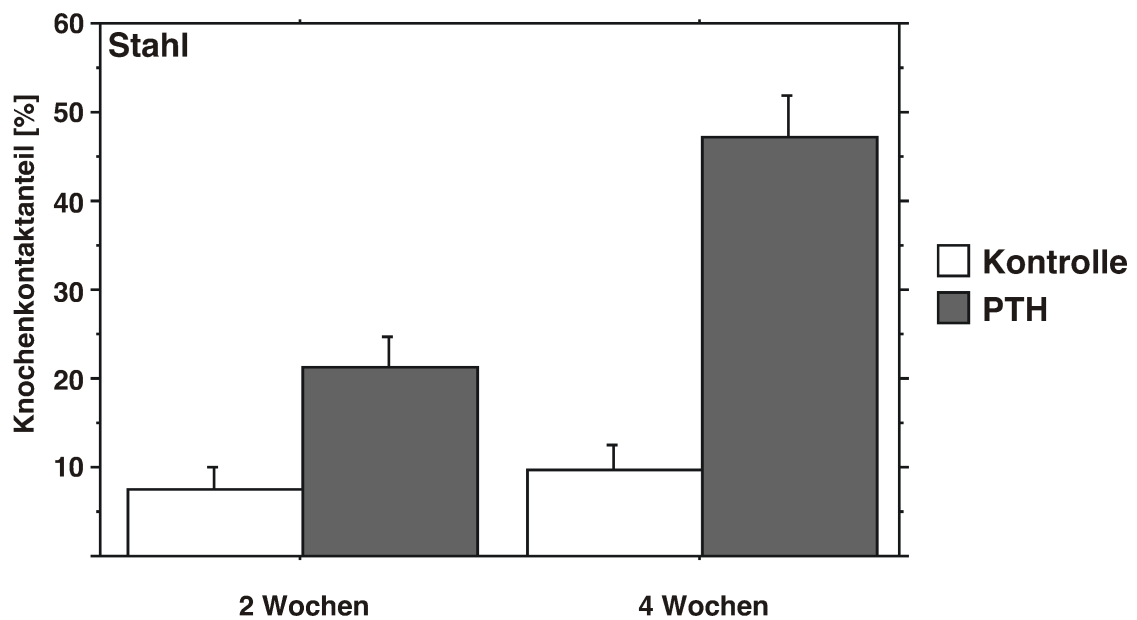


Abb. 26: Knochenkontaktanteil in % ( $\pm$  Standardabweichung) bei den Metallimplantaten

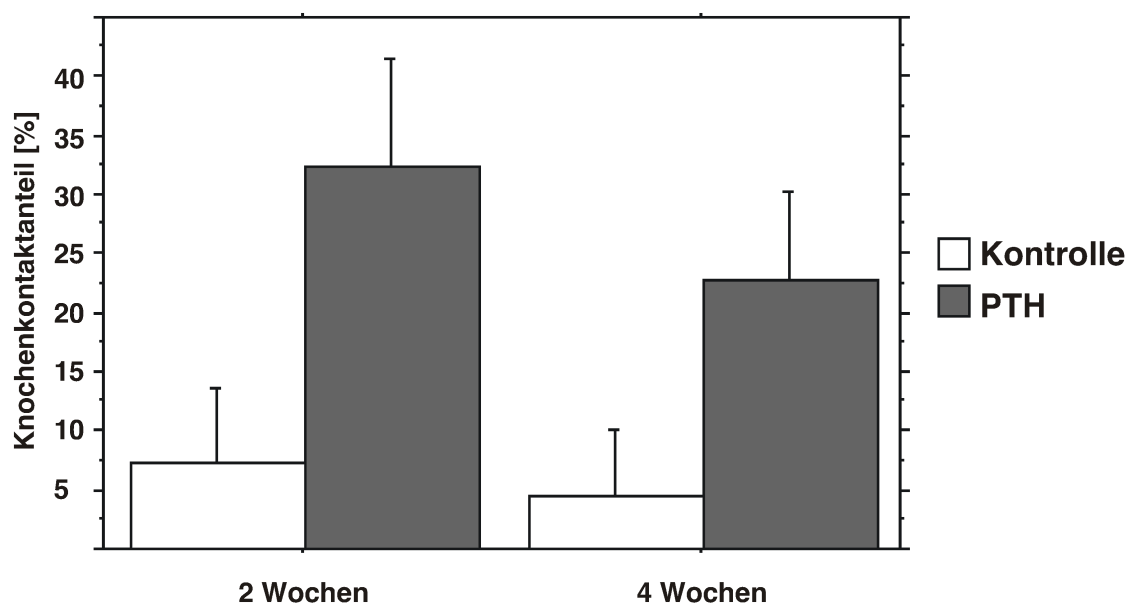


Abb. 27: Differenz PMMA/Metall

PTH-Kontrollgruppe (Abbildungen 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 und 35).

Abbildung 27 auf Seite 52 zeigt die Differenz des prozentualen Knochenanteils bei Implantation des PMMA- bzw. des Metallstabs. Aus dem Diagramm wird deutlich, dass in der PTH-Gruppe der Unterschied zwischen PMMA- und Metallimplantat mit 32,45 % weitaus größer ist, als in der Kontrollgruppe mit 7,32 %. Während der Unterschied nach 2 Wochen noch das 4,4 fache beträgt, fanden wir nach 4 Wochen trotz sinkendem absoluten Unterschied zwischen PTH- und Kontrollgruppe sogar das 5,5 fache des Wertes bei Metallimplantaten (siehe auch Tab. 7).

#### 4.4 Knochendichte-Bestimmung

Die Volumetrische Dichte  $V_v$  gibt den prozentualen Anteil der knöchernen Interzellulärsubstanz am Gesamtvolumen an und ergab folgende Ergebnisse:

Beim PMMA-Implantat ergab sich nach 2 Wochen in der PTH-Gruppe mit 46,76 % gegenüber der Kontrollgruppe mit 22,89 % eine 2-fache Volumetrische Dichte, die nach 4 Wochen jedoch auf das 1,4-fache absank. Beim Stahl-Implantat zeigte sich bereits nach 2 Wochen eine 4,1-fach höhere Volumetrische Dichte in der PTH-Gruppe, die nach 4 Wochen das 1,7-fache betrug.

Die Oberflächendichte  $S_v$  betrug beim Stahlimplantat das 1,5-fache gegenüber der Kontrollgruppe, sank jedoch nach 4 Wochen deutlich ab. Beim PMMA-Implantat ist die Oberflächendichte

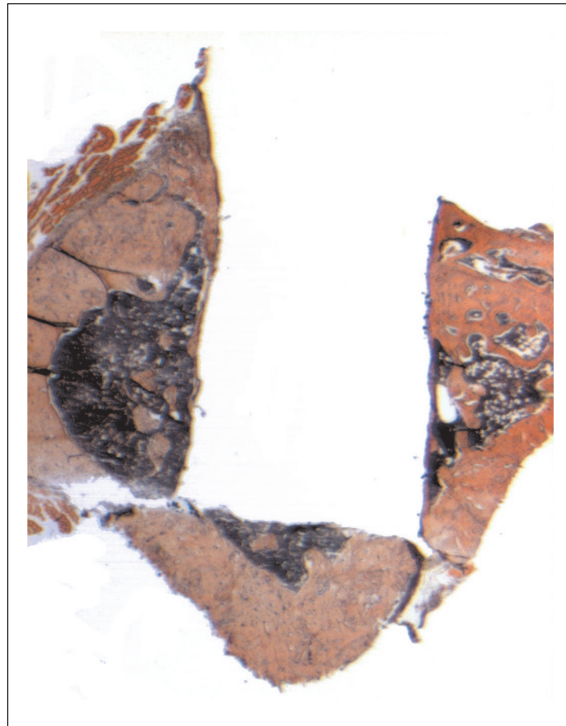




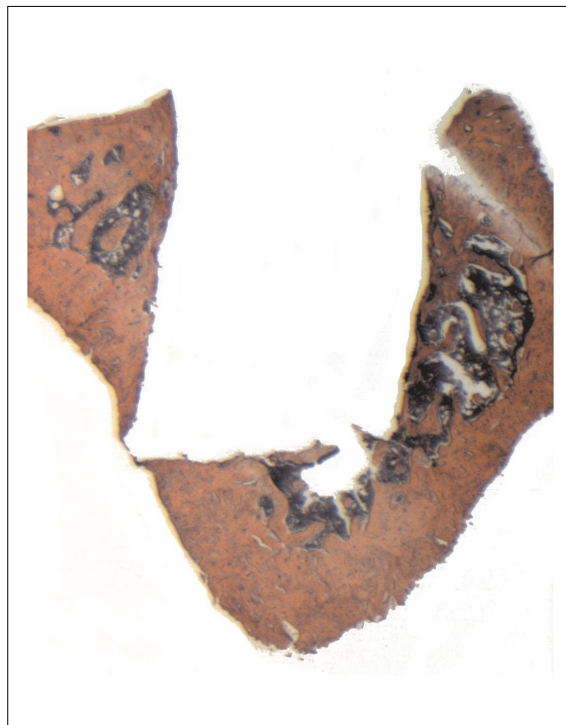
**Abb. 28:** Kontrollgruppe, 2 Wochen, Zementstab (1,25x1)



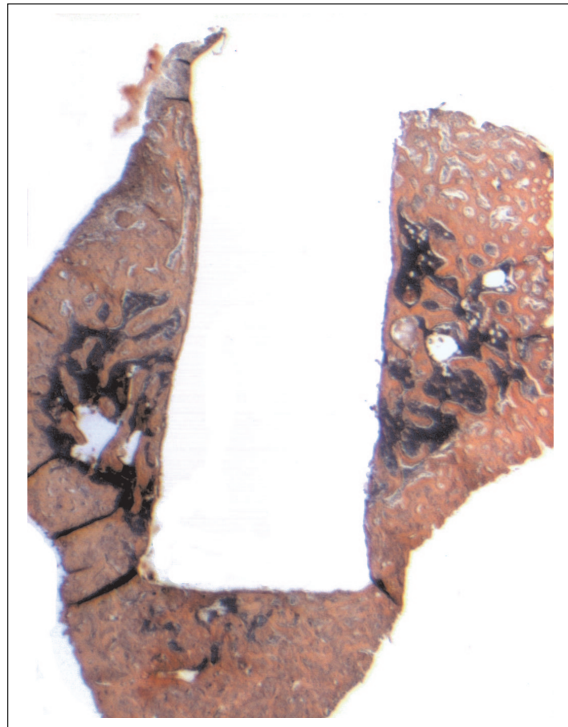
**Abb. 29:** PTH-Gruppe, 2 Wochen, Zementstab (1,25x1)



**Abb. 30:** Kontrollgruppe, 4 Wochen, Zementstab (1,25x1)



**Abb. 31:** PTH-Gruppe, 4 Wochen, Zementstab (1,25x1)



**Abb. 32:** Kontrollgruppe, 2 Wochen, Metallstab (1,25x1)



**Abb. 33:** PTH-Gruppe, 2 Wochen, Metallstab (1,25x1)



**Abb. 34:** Kontrollgruppe, 4 Wochen, Metallstab (1,25x1)



**Abb. 35:** PTH-Gruppe, 4 Wochen, Metallstab (1,25x1)

**Tab. 10:** Volumetrische Dichte der Tibiae

	<b>Vol. Dichte</b>	
	[%]	
	<b>Kontrolle</b>	<b>PTH</b>
<b>PMMA 2 Wochen</b>	22,89	46,76
<b>Stahl 2 Wochen</b>	16,03	65,97
<b>PMMA 4 Wochen</b>	25,13	34,29
<b>Stahl 4 Wochen</b>	21,81	36,52

**Tab. 11:** Oberflächendichte der Tibiae

	<b>Oberflächendichte</b>	
	[ $mm^2/cm^3$ ]	
	<b>Kontrolle</b>	<b>PTH</b>
<b>PMMA 2 Wochen</b>	364,6	391,16
<b>Stahl 2 Wochen</b>	342,44	519,87
<b>PMMA 4 Wochen</b>	343,6	281
<b>Stahl 4 Wochen</b>	291,77	201,83

$S_v$  bei der PTH- und Kontrollgruppe nach 2 Wochen nahezu gleich. Die spezifische Oberfläche  $S/V$  lag in der PTH-Gruppe sowohl nach 2 als auch nach 4 Wochen unter der der Kontrollgruppe (siehe auch Tab. 10, 11 und 12).

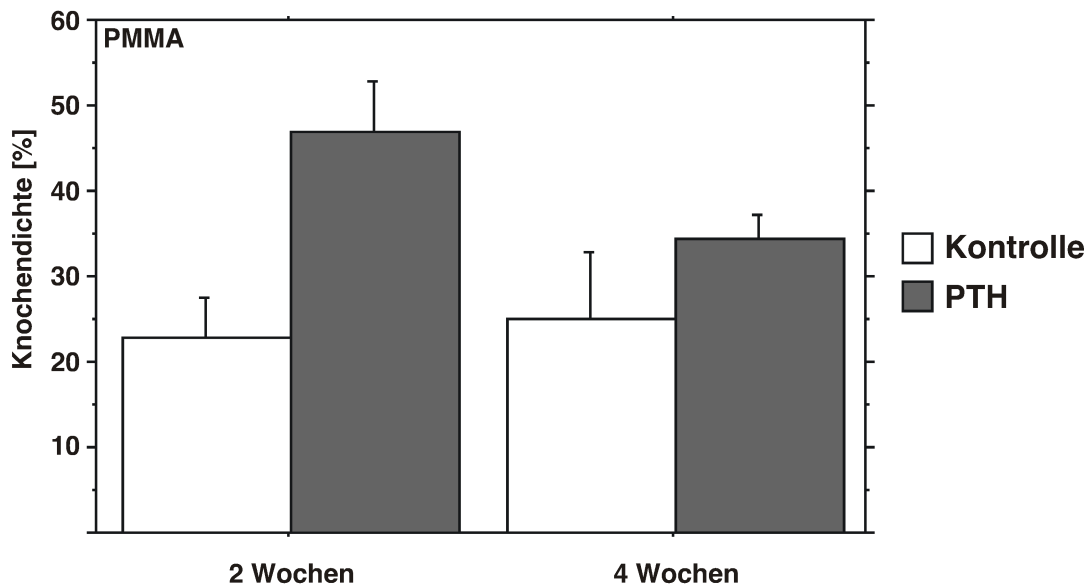
#### 4.5 Knochendichtemessung der Femure

Um den Einfluss von PTH auf normalen, nicht frakturierten Knochen beurteilen zu können, wurde die Knochendichte je eines Femurs aller Versuchstiere ebenfalls mittels des Merz-Grids untersucht. Abb. 38 zeigt auch hier eine deutlich höhere Knochendichte unter PTH-Behandlung, sowohl in der 2- als auch in der 4-Wochen-Gruppe.

Die Volumetrische Dichte der Femure betrug in der PTH-Gruppe nach 2 Wochen mit 11 % das 2,4-fache gegenüber der Kontrollgruppe mit 4,5 %, während die Dichte nach 4 Wochen auf das 1,6-fache der Kontrollgruppe gesunken ist (siehe auch Tab. 13).

**Tab. 12:** Spezifische Oberfläche der Tibiae

	spez. Oberfläche	
	[mm <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> ]	
	Kontrolle	PTH
PMMA 2 Wochen	69,00	33,05
Stahl 2 Wochen	82,21	30,85
PMMA 4 Wochen	67,00	30,60
Stahl 4 Wochen	51,80	22,93



**Abb. 36:** Knochendichte der Tibiae (PMMA) in % (Merz-Grid-Auswertung, 50 × 1,25)

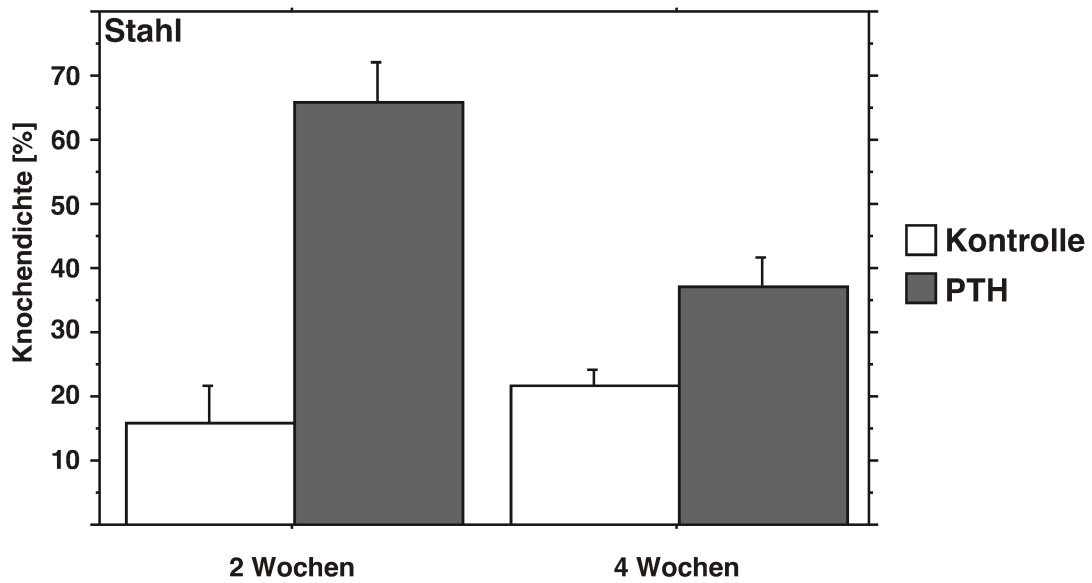


Abb. 37: Knochendichte der Tibiae (Stahl) in % (Merz-Grid-Auswertung,  $50 \times 1,25$ )

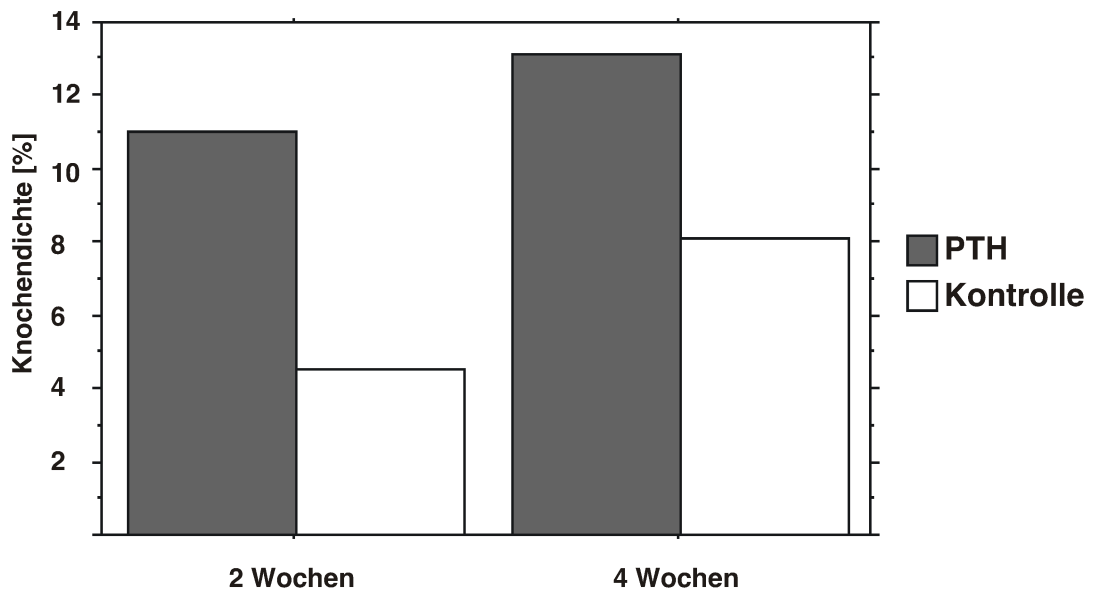


Abb. 38: Knochendichte der Femure in % (Merz-Grid-Auswertung)

**Tab. 13:** Volumetrische Dichte der Femure

	$V_v\%$
<b>Kontrolle 2 Wochen</b>	4,5
<b>PTH 2 Wochen</b>	11,0
<b>Kontrolle 4 Wochen</b>	8,1
<b>PTH 4 Wochen</b>	13,1



## 5 Diskussion

### 5.1 Anabole Eigenschaften von PTH

Lange Zeit kannte man nur die katabolen Effekte des PTH zur Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase. Wie inzwischen gezeigt werden konnte, verfügt dieses Hormon auch über anabole Wirkungen und wurde somit zum vielversprechenden Hoffnungsträger nicht nur in der Behandlung der Osteoporose (FUJITA ET AL., 1999; LINDSAY ET AL., 1997), sondern auch zur Optimierung der Frakturheilung (HOLZER ET AL., 1999; ANDREASSEN, EJERSTEDT, 1999; JAHNG, KIM, 2000) sowie zur Fixation orthopädischer Implantate.

Bisherige Grundlagenstudien untersuchten vor allem an Ratten die anabolen Effekte des PTH und konnten zeigen, dass eine intermittierende Hormongabe sowohl die Anzahl als auch die Aktivität der Osteoblasten zu erhöhen vermag (DOBNIG, TURNER, 1995). NISHIDA et al. (1994) fanden bereits nach einer 5maligen hPTH-Behandlung mit 30 µg/kgKG innerhalb einer Woche eine deutliche Stimulierung der Osteoblastendifferenzierung; zur Vermehrung der Knochenmasse und -dichte war bei dieser Dosierung jedoch eine 3wöchige Behandlung nötig. PTH induzierte hierbei sowohl die Zahl der colony forming unit-fibroblastic (CFU-F) als auch die Zahl der Alkalische Phosphatase positiven CFU-F, so dass die anabolen Eigenschaften von PTH auf die Stimulation der Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zurückzuführen wären.

Demgegenüber gelang es DOBNIG und TURNER (1995) mit Hilfe von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Thymidin zu zeigen, dass die entstehenden Osteoblasten nicht aus Progenitorzellen hervorgingen, sondern vielmehr aufgrund einer Aktivierung von bereits bestehenden Bone-Lining-Cells, die sich daraufhin zu Osteoblasten differenzieren. Da Bone-Lining-Cells, auch ruhende Osteoblasten genannt, jedoch nicht weiter proliferieren können, ist das Ausmaß der PTH-Antwort von der bestehenden Bone-Lining-Zellzahl abhängig (QI et al, 1994).

Bereits die mechanischen Versuche von SKRIPITZ und ASPENBERG (2000) mittels *Pull-Out-Screws* konnten den anabolen Effekt von PTH nachweisen, was auch in dieser Studie bestätigt werden konnte. So zeigte sich bereits nach zwei Wochen ein deutlich erhöhter Knochenkontaktanteil vom 6,8fachen beim PMMA-Implantat, bzw. vom 2,9fachen beim Stahl-Implantat (jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe). Die volumetrische Dichte konnte durch PTH-Gabe nach vier Wochen auf das zweifache beim PMMA-Implantat und sogar auf das 4,1fache beim Stahlimplantat gesteigert werden (jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe, siehe Tabelle 16). Das Körpergewicht

wurde durch PTH nicht positiv beeinflusst (siehe Tabelle 5 und Abbildungen 19 bis 22).

## 5.2 Mögliche intrazelluläre Mechanismen der PTH-Wirkung

Der genaue intrazelluläre Mechanismus der anabolen Wirkungen ist noch unbekannt; dennoch hat es hierzu bereits einige Studien gegeben. So haben CANALIS et al. 1989 die PTH-Eigenschaften *in vitro* an Knochenkulturen der Ratte untersucht und festgestellt, dass eine intermittierende 24stündige PTH-Exposition von 1-100 nM eine Erhöhung der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)-Konzentration um das 2 bis 4fache verursachte.

1992 konnten HOCK et al. dann zeigen, dass eine kontinuierliche PTH-Gabe *in vivo* zwar ebenfalls zu einer vermehrten IGF-1-mRNA-Bildung führte, IGF-1 jedoch nicht vermehrt sezerniert wurde. Daraus schloss man, dass dies nur bei Abwesenheit von PTH möglich ist. Die kontinuierliche PTH-Gabe verursacht eine Inhibition der Kollagen-Synthese, welche durch IGF-1 stimuliert wird.

WATSON et al. (1999) konnten eine vermehrte Expressierung von IGF-1 nach intermittierender PTH-Behandlung an weiblichen Ratten bestätigen und zeigten zudem, dass alle Osteoblasten positiv für die IGF-bindenden Proteine (IGF-BP) 3,4 und 5 waren. IGF-BP 4 gilt als Inhibitor von IGF-1 (CANALIS et al., 1989; JONES et al. 1995) und könnte somit eine mögliche Ursache dafür sein, warum eine kontinuierliche PTH-Gabe keine anabolen Auswirkungen hat (TAM et al., 1982).

Für die mitogenen Effekte von PTH könnten jedoch auch andere Regulatoren des Bone Remodeling verantwortlich sein, wie z.B. der Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , der ein potentes Mitogen von Knochenzellen ist und dessen Bindung an seinen Rezeptor immerhin von PTH reguliert wird (CENTRELLA et al., 1985, 1987, 1988).

ONYIA et al. (1995) berichten über eine schnelle, aber kurz währende Expression von sogenannten immediate early genes (IEG), Protoonkogenen namens c-fos, c-jun und c-myc sowie von Interleukin (IL)-6-mRNA nach einer subcutanen Injektion von 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG an Ratten. Durch diese vorübergehende Stimulation der IEG und IL-6 wird die Zelldifferenzierung gefördert, während gleichzeitig die Zellproliferation gesenkt wird, was sich in einer Inhibition von Histon H4-mRNA zeigt. IL-6 gehört somit ebenfalls zu den potentiellen beeinflussenden Faktoren der anabolen PTH-Wirkung (BERTOLINI et al., 1994; HOLT et al., 1994).

Über welchen Signalweg die mitogene Wirkung von PTH verläuft, ist bislang noch nicht endgültig geklärt. ISHIZUYA et al. (1997) vermuteten in einer *in vitro* Studie, dass das cAMP/Proteinkinase (PK) A-System für die inhibitorische Wirkung von PTH verantwortlich ist, während eine Stimu-

### 5.3 Ist der PTH-Effekt auf regenerierenden Knochen größer als auf normalen spongiösen Knochen?

---

lation der Osteoblastendifferenzierung sowohl über das cAMP/PKA-System als auch durch das  $\text{Ca}^{++}$ /Proteinkinase(PK) C-System initiiert wird.

PTH-Rezeptoren der Niere *in vivo* (MAHONEY et al., 1983; TOMLINSON et al., 1976) sowie osteoblast-like Osteosarkomzellen *in vitro* (PUN et al., 1990) wurden innerhalb einer Stunde nach PTH-Exposition refraktär und hatten für 16-24 Stunden eine verminderte Affinität gegenüber einer weiteren Hormongabe. Folglich limitiert die kontinuierliche PTH-Gabe die Möglichkeit des Rezeptors, *second messenger* zu aktivieren. Diese Erkenntnis konnte von LEE et al. (1994) sowie von ISHIZUYA et al. (1997) bestätigt werden. In den aktivierten, cytoplasmareichen Osteoblasten (LEAFFER et al., 1995) der Knochenoberfläche fand man vermehrt mRNA für den PTH/PTHrP-Rezeptor, dessen Downregulation durch PTH selbst erfolgt, während flache, inaktive Osteoblasten keinen PTH-PTHrP-Rezeptor exprimieren (LEE et al., 1994).

### 5.3 Ist der PTH-Effekt auf regenerierenden Knochen größer als auf normalen spongiösen Knochen?

Eine tägliche PTH-Gabe von 80  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  über 21 Tage verbessert und beschleunigt die Frakturheilung bei Ratten und bewirkt somit eine höhere Knochendichte sowie eine verstärkte Kallusbildung (HOLZER et al., 1999). ANDREASSEN, EJERSTEDT (1999) untersuchten die dosisabhängige Wirkung und verglichen eine low dose Therapie (60  $\mu\text{g}/\text{kg /d}$ ) mit einer high dose Behandlung (200  $\mu\text{g}/\text{kg /d}$ ) über 20 bzw. 40 Tage an Ratten mit Tibiaschaftfraktur. Es zeigte sich, dass zur verstärkten Kallusbildung die höhere Dosis nötig ist, der Mineralgehalt des Knochens jedoch auch bereits durch die niedrigere Dosis anstieg. Zudem beeinflusst PTH nicht nur frakturierten Knochen, sondern förderte auch in der kontralateralen intakten Tibia eine Zunahme des Mineralgehalts, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als beim regenerierenden Knochen (ANDREASSEN, EJERSTEDT, 1999).

Dies zeigten auch die Bone Conduction Chamber (BCC)-Versuche an Ratten von SKRIPITZ, ASPENBERG (2000), in denen der PTH-Effekt auf den in die Knochenkammer einwachsenden Knochen mit 73 % deutlich höher war als der Einfluss auf den Lendenwirbelkörper mit 56 % bzw. den Femur desselben Versuchstiers mit 14 %.

In dieser Studie untersuchten wir ebenfalls die Knochendichte der regenerierenden Tibiae sowie des intakten Femurs mit Hilfe des Merz-Grids. Die Knochendichte (Tab. 14) der PTH-behandelten Tiere betrug bei den Tibiae mit dem PMMA-Implantat nach 2 Wochen das doppelte und sank nach

**Tab. 14:** Vergleich der Volumetrischen Dichte [%] nach 2 und nach 4 Wochen

	PMMA	Stahl	Femur
	[%]	[%]	[%]
<b>Kontrolle 2 W</b>	25,13	21,81	4,5
<b>PTH 2 W</b>	34,29	36,52	11
<b>Kontrolle 4W</b>	22,89	16,03	8,1
<b>PTH 4 W</b>	46,76	65,97	13,1

4 Wochen auf das 1,4-fache gegenüber der Kontrollgruppe an. Die Tibia mit dem Stahlimplantat zeigte nach 2 Wochen sogar einen Anstieg vom 4,1-fachen, welches sich nach 4 Wochen jedoch auf das 1,7-fache reduzierte. Die Knochendichte der Femure der PTH-behandelten Ratten betrug nach 2 Wochen das 2,4-fache gegenüber der Kontrollgruppe, sank dann jedoch auf das 1,6-fache nach 4 Wochen ab. Folglich wurde ein Einfluss auf intakten, nicht regenerierenden Knochen bestätigt, der anscheinend vor allem in der Anfangsphase auftritt und später nachlässt.

Neben der unterschiedlichen Wirkung auf frakturierten gegenüber intakten Knochen, zeigt PTH zudem regionale Besonderheiten. EJRSTEDT et al. (1997) berichteten über eine verstärkt mineralisierte Knochenoberfläche sowohl periostal als auch endostal und zeigten, wie BARON et al bereits 1984, dass die Knochenbildungsrate nach PTH-Gabe auch altersabhängig ist und dementsprechend mit zunehmendem Alter abnimmt. Gleichzeitig verlieren ältere Ratten jedoch auch den neu geformten Knochen langsamer als junge Tiere (EJRSTEDT et al., 1997).

Des weiteren bewirkt PTH eine Stimulation der Knochenbildung von 7–13 % im Lendenwirbelkörper (LWK) bei Frauen mit Osteoporose, während die Wirkung auf den proximalen Femur mit einer Erhöhung um nur 1–4 % deutlich geringer ausgeprägt ist (HODSMAN et al., 1997; LINDSAY et al., 1997; DEMPSTER et al., 1993). Dass die Wirkung von PTH auf Spongiosa stärker ist als auf kortikalen Knochen konnte u.a. durch ZHANG et al. (1997) und HIRANO et al. (1999) gezeigt werden. Dies konnte jedoch nicht die unterschiedliche Wirkung auf den LWK gegenüber dem Femur erklären, da beide reich an spongiösem Knochen sind. LIANG et al. (1999) untersuchten daraufhin, ob die PTH-Wirkung abhängig davon ist, dass ein Knochen gelbes oder rotes Knochenmark besitzt, was sich jedoch nicht bestätigte. Der Effekt von PTH ist zwar regionell verschieden, hängt jedoch nicht von der Art des Knochenmarks ab.

HALLORAN et al. (1997) berichteten ebenfalls über eine regionabhängige Wirkung und zudem

über einen belastungsabhängigen PTH-Effekt. PTH kann den Knochenmassenverlust bei fehlender Belastung zwar nicht reduzieren, erhöht jedoch die Ansprechbarkeit von kortikalem Knochen auf PTH und damit bei anschließender Belastung die Knochenmasse und gilt somit in Form einer intermittierenden Gabe als ein effektiver Weg zum Schutz von nicht belasteten Knochen.

#### **5.4 Kann PTH die Integration eines Edelstahl- bzw. eines PMMA-Implantats verbessern?**

SKRIPITZ et al. (2000) zeigten bereits mittels physikalischer Tests, dass die dreimal wöchentliche Injektion einer PTH- Dosis von 60 µg/kg KG die Implantation von Schrauben und Metallstäben verbessert. Um jedoch den exakten prozentualen Anteil des Implantat-Knochen-Kontakts zu bestimmen, ist eine glatte, ebene Oberfläche nötig, wie sie die Stahl- bzw. PMMA-Stäbe dieser Studie zeigen.

Bereits nach 2 Wochen einer PTH-Injektion von 60 µg/kg KG dreimal pro Woche zeigte sich bei den PTH-behandelten Tieren ein 6,8fach höherer Knochenkontaktanteil des PMMA-Stabs sowie ein 2,9facher Kontakt beim Stahlimplantat, welcher sich nach 4 Wochen sogar auf das 4,8fache der Kontrollgruppe steigerte (siehe Tabelle 16). PTH verbessert also die primäre Implantatintegration deutlich und könnte somit potentiell eine spätere Revisionsoperation aufgrund primärer Instabilität verhindern. Zwar sind die Knochen von Ratten nicht wie beim Menschen aus Osteonen aufgebaut und besitzen keine intrakortikalen Haversschen Systeme (HIRANO et al., 1999; KIMMEL, 1996); gleichwohl existiert eine *Bone Remodeling Phase*, d.h. Knochenresorption und -formation, die mit 31 Tagen (LI, 1991) entgegen 3 bis 5 Monaten beim Menschen deutlich kürzer und somit für Studien gut geeignet ist. Da Ratten jedoch auch eine stärkere Knochenheilungskapazität besitzen und der Knochen sensitiver für die anabolen Wirkungen von PTH ist (LIANG et al., 1999), könnten größere Tiermodelle, die über ein Haverssches System verfügen, im Hinblick auf die Anwendung und Wirkungen am Menschen nützlich sein.

ZHANG et al. (1997) untersuchten den PTH-Effekt auf den 5. Lendenwirbelkörper an 20 Monate alten Beagles und erreichten auch hier eine Verbesserung der Spongiosaformation, v.a. in der stärker belasteten Region des Wirbelkörpers. Es stellte sich jedoch heraus, dass auch Beagles nur bedingt ein geeignetes Tiermodell waren, da PTH hier eine peritrabekuläre Fibrose verursachte (BOYCE et al., 1996). Weitere Studien an Affen oder Frettchen (JEROME et al., 1995; MACKEY et al., 1995) berichteten über eine erhöhte Mineralgehaltdichte (*Bone Mineral Density*). HIRANO et al. (1999)

stellten das Kaninchen als kleinstes Tiermodell mit intrakortikalem Havers-System und Remodeling vor, das sich durch seine frühe skeletale Reife nach 6–9 Monaten und einer Remodeling-Phase von 70 Tagen entgegen 90 Tagen und mehr bei Hunden und Primaten sehr gut zur Untersuchung des PTH-Effekts auf kortikalen Knochen eigne. Es zeigte sich nach einer 140 tägigen Behandlung mit einer Dosis von 40 µg/kg KG PTH (fünf mal pro Woche) eine 20fache Erhöhung der intrakortikalen *Activation frequency* sowie eine 6fach höhere kortikale Porosität.

PTH-Studien am Menschen beziehen sich hauptsächlich auf die Osteoporose-Behandlung (FUJITA et al., 1999; LINDSAY et al., 1997; HODSMANN et al., 1997; HESCH et al., 1989; SLOVIK et al., 1986; REEVE et al., 1981, 1980) und sind durch die verschiedenen Behandlungsschemata mit unterschiedlicher Dosis und Behandlungsdauer nur schwer miteinander vergleichbar. Es zeigt sich jedoch auch hier eine stärkere PTH-Wirkung auf spongiösen Knochen als auf die Kortikalis, was sich v.a. in einem erhöhten Knochenmineralgehalt und damit einer Verringerung pathologischer Frakturen äußert.

### **5.5 Unterscheidet sich die PTH-induzierte Knochenintegration im Stahlimplantat von der im PMMA-Implantat?**

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein Unterschied zwischen Stahl und PMMA sowohl im Implantat-Knochen-Kontakt als auch in der Knochendichte. Während PTH nach 2 Wochen beim PMMA-Stab mit 53,56 % einen 6,8fach höheren Implantat-Knochen-Kontakt verursachte, ergab dies beim Stahlimplantat lediglich das 2,9fache gegenüber der Kontrollgruppe (siehe auch Tab 16 auf Seite 68). Nach 4 Wochen bestand allerdings kein Unterschied mehr zwischen PMMA und Stahlimplantat.

PTH scheint also vor allem in der Anfangsphase der Implantatintegration das Anwachsverhalten des Knochens an PMMA stärker als das an Edelstahl zu beeinflussen. Ursächlich hierfür könnte die höhere Oberflächenrauigkeit von PMMA sein, welche für die Knochenzellen eine ideale Voraussetzung zur Bildung einer Primärstabilität darstellt. Nach 4 Wochen scheint die Roughness des untersuchten Implantatmaterials jedoch keine wesentliche Rolle mehr zu spielen. Aufgrund der Ergebnisse in Tab. 16, wonach der Knochenkontaktanteil jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 4 Wochen beim PMMA-Implantat das 4,6fache und beim Stahlimplantat das 4,8fache betrug, ist davon auszugehen, dass das anfänglich bessere Einwachsverhalten bei PMMA mit der Zeit nachlässt. In der Kontrollgruppe zeigte sich der Unterschied zwischen PMMA und Stahl mit

**Tab. 15:** Differenz des Knochenkontaktanteils zwischen PMMA und Stahl nach 2 und nach 4 Wochen  
(angegeben als Vielfaches der Kontrollgruppe)

Behandlungsdauer	Differenz PMMA/Stahl
2 Wochen	4,4fach
4 Wochen	5,5fach

7,32 % Differenz nach 2 Wochen bzw. 4,51 % nach 4 Wochen (siehe auch Tabelle 7 auf Seite 50 und Tabelle 15) nicht ganz so deutlich, was jedoch auf die relativ kurze Behandlungsdauer von nur 4 Wochen zurückzuführen sein dürfte.

Bei Betrachtung der Volumetrischen Dichte allerdings scheint das Stahlimplantat bereits nach der 2 wöchigen Behandlung bessere Ergebnisse zu erzielen. Hier zeigt sich eine 4fach höhere Dichte, während beim PMMA-Implantat lediglich eine doppelt höhere Dichte gegenüber der Kontrollgruppe erzielt wird (siehe auch Tab 17 auf Seite 68).

Führt man sich die primäre Instabilität von Prothesen aufgrund der Ausbildung einer fibrösen Bindegewebsschicht zwischen Knochen und Implantat als Ursache für eine spätere Lockerung vor Augen, so sollte der Vorteil des höheren Implantat-Knochen-Kontakts bei PMMA überwiegen. Dennoch muss man natürlich bedenken, dass eine Implantation von bereits ausgehärteten, abgekühlten Zementstäben natürlich nicht die in vivo Bedingungen von zementierten Prothesen widerspiegelt. Bereits die entstehende Hitze und die damit zusammenhängende Nekrose könnten die in dieser Studie erzielte positive Wirkung negativ beeinträchtigen.

## 5.6 Ist der PTH-Effekt zeitabhängig?

ISHIZUYA et al. (1997) berichteten über eine verstärkte Osteoblastendifferenzierung bereits nach einer 6 stündigen Inkubationszeit einer Knochenkultur. Auch ONYIA et al. (1995) registrierten eine vermehrte Expression des *immediate early gene* c-fos bereits 15 Minuten nach PTH-Gabe. Eine einwöchige Behandlung mit 50 µg/kg KG an Ratten führt zu einer dramatischen Verstärkung der Zellentwicklung, was sich durch mehrreihige Lagen großer, plumper Osteoblasten äußert (WATSON et al., 1999). Die Studie von NISHIDA et al. (1994) ergab jedoch bei einer Dosis von 30 µg/kg KG weder ein vermehrtes Spongiosavolumen noch einen Einfluss auf die kortikale Dicke oder die Knochendichte. In dieser Studie wählten wir eine 2 und eine 4wöchige Behandlungsdauer, um die Abhängigkeit der anabolen PTH-Wirkung von der Zeit zu ermitteln. Es zeigte sich, dass sich beim

**Tab. 16:** 2 und 4 Wochen PTH-Behandlungsdauer im Vergleich  
(angegeben jeweils als ein Vielfaches der Kontrollgruppe)

Behandlungsdauer	Knochenkontakt	
	PMMA	Stahl
<b>2 Wochen</b>	6,8-fach	2,9-fach
<b>4 Wochen</b>	4,6-fach	4,8-fach

**Tab. 17:** Volumetrische Dichte der PTH-behandelten Tiere im 2 und 4 Wochen-Vergleich (angegeben jeweils als ein Vielfaches der Kontrollgruppe)

Behandlungsdauer	Vol. Dichte [%]	
	PMMA	Stahl
<b>2 Wochen</b>	2-fach	4,1-fach
<b>4 Wochen</b>	1,4-fach	1,7-fach

Stahlimplantat die längere Behandlungsdauer von 4 Wochen positiv auf den Implantat-Knochenkontakt auswirkte, was sich in einer Steigerung vom 2,9- auf das 4,8fache der Kontrollgruppe äußerte. Beim PMMA-Stab ging der Knochenkontakt jedoch vom 6,8fachen nach 2 Wochen auf das 4,6fache der Kontrollgruppe nach 4 Wochen zurück (siehe Tab. 16). Absolut gesehen stieg der Implantat-Knochenkontakt des PMMA-Stabs dennoch von 53,56 % nach zwei Wochen auf 65,6 % nach vier Wochen an (siehe Tabelle 6 auf Seite 47). Zudem sank die Volumetrische Dichte auf der Seite mit PMMA-Stab vom 2-fachen nach 2 Wochen auf das 1,4-fache nach 4 Wochen. Das Stahlimplantat dagegen zeigte eine 4,1-fache höhere Volumetrische Dichte nach 2 Wochen, die nach 4 Wochen jedoch auf das 1,7-fache absank (siehe Tab. 17).

Die PTH-Wirkung ist folglich zeitabhängig und das Ausmaß der anabolen Effekte zusätzlich abhängig von der Beschaffenheit des Implantats.



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Möglichkeit einer Verbesserung der Implantat-Integration durch eine 2 bzw. 4 wöchige Behandlung mit hPTH (1-34) in einer Dosis von 60 mg/kg KG 3 mal wöchentlich an männlichen Wistar-Ratten histomorphometrisch untersucht. Hierzu wurde den Tieren je ein PMMA- sowie ein Stahlimplantat pro Tibia implantiert. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Tibiae entnommen und histologisch aufgearbeitet. In der anschließenden histomorphometrischen Untersuchung zeigte sich eine signifikante Erhöhung des direkten Implantat-Knochen-Kontakts nach PTH-Behandlung sowohl nach 2 als auch nach 4 Wochen. Während auf der Seite des PMMA-Stabs nach 2 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ein 6,8fach höherer Implantat-Knochen-Kontakt zu beobachten war, lag dieser beim Stahlimplantat lediglich beim 2,9fachen der Kontrollgruppe. Eine Fortführung der Behandlung über weitere 2 Wochen schien sich beim Stahlimplantat mit einer weiteren Erhöhung des Knochenkontakts vom 2,9 auf das 4,8fache positiv auszuwirken. Nach 4 Wochen gab es folglich kaum noch einen Unterschied bezüglich des Knochenkontaktes zwischen PMMA- und Stahlimplantat.

Ursächlich für die bessere Implantat-Integration ist vermutlich die größere Roughness von PMMA, was der Vergleich der Differenz zwischen PMMA und Stahl in der PTH-Gruppe mit der in der Kontrollgruppe zeigte.

In Bezug auf die mit Hilfe des Merz-Grids ermittelte Volumetrische Dichte der Tibiae war ebenfalls eine positive Beeinflussung durch PTH zu vermerken, genaugenommen um das Doppelte beim PMMA- und um das 4,1-fache beim Stahlimplantat. Während beim PMMA-Implantat bei Fortführen der PTH-Behandlung um weitere 2 Wochen ein Absinken auf das 1,4-fache der Kontrollgruppe zu verzeichnen war, erfolgte beim Stahlimplantat eine Erniedrigung der volumetrischen Dichte auf das 1,7-fache der Kontrolle. Die Effekte der PTH-Behandlung scheinen nicht nur von der Zeit und der Dosis, sondern auch von den Implantatoberflächeneigenschaften abhängig zu sein.

Die Auswirkung auf intakten spongiösen Knochen wurde ebenfalls mittels Merz-Grid ausgewertet und zeigte eine positive Beeinflussung durch PTH, was sich in einer gegenüber der Kontrollgruppe höheren Volumetrischen Dichte der Femure bemerkbar machte.

Insgesamt ist also eine deutliche Verbesserung der histologisch verifizierten Implantat-Integration nach PTH-Behandlung zu verzeichnen, was in Bezug auf eine primäre Instabilität chirurgischer Implantate aufgrund einer fibrösen Bindegewebsschicht zwischen Knochen und Implantat eine spätere Lockerung verhindern könnte. Um eine klinische Relevanz dieser Behandlung genauer beurteilen

zu können, sind jedoch weitere Studien nötig.

## Literatur

- Allen M., Brett F., Millett P., Rushton N. (1996) The effects of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface. *J Bone Joint Surgery* 78-B: 32-37
- Andreassen T.T., Ejersted C. (1999) Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Min Res* 14/6: 960-967
- Andreassen T.T., Jørgensen P.H. (1995) Growth Hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Min. Res.* 10/7: 1057-1067
- Andreassen T.T., Melsen F. (1996) The influence of growth hormone on cancellous and cortical bone of the vertebral body in aged rats. *J Bone Min. Res.* 11/8: 1094-1101
- Anthony P.P., Gie G.A., Howie C.R., Ling R.S.M.(1990) Localised endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg* 72-B:971-979
- Armamento-Villareal R., Ziambaras K. (1997) An intact N terminus is required for the anabolic action of parathyroid hormone on adult female rats. *J Bone Min. Res* 12/3: 384-92
- Ascherl, R. (1990) Die gelockerte Hüftprothese: Ursachen und therapeutische Konsequenzen. Schattauer, Stuttgart
- Aspenberg P., Jeppsson C. (1996) Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: A comparison using bone chambers in rats. *Bone* 19/5: 499-503
- Aspenberg P., Vis, van der H.(1998) Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis. *Acta Orthop Scand* 69 (1): 1-4
- Aspenberg P., Vis, van der H.(1998) Migration, particles, and fluid pressure. *Clin Orthop Rel Res* 352:75-80
- Bak B., Jørgensen P. (1988) The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop Rel Res*: 295-301
- Baron R., Tross R., Vignery A. (1984). Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: Morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. *Anat Rec* 208: 137-145

- Bauer W., Aub J. C., Albright F. (1928). Studies of calcium phosphorus metabolisms: study of bone trabeculae as ready available reserve supply of calcium. *J Exp Med* 49: 145–162
- Bertolini D.R., Votta B., Hoffmann S., Strassmann G. (1994). Interleukin 6 production in fetal rat long bone cultures is correlated with PGE2 release and does not correlate with the extent of bone resorption. *Cytokine* 6: 368-375
- Böcker, Denk, Heitz (2001) Knochen. In: Pathologie, Urban & Fischer, München Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, (2.Auflage), S 957-971
- Bostrom M.P.G., Gamradt S.C. (2000) Parathyroid hormone-related protein analog RS-66271 is an effective therapy for impaired bone healing in rabbits on corticosteroid therapy. *Bone* 26/5: 437-442
- Boyce R.W., Paddock C.L., Franks A.F., Jankowsky M.L., Eriksen E.F. (1996). Effects of intermittent hPTH (1-34) alone and in combination with 1,25 (OH)2D3 or risedronate on endosteal bone remodeling in canine cancellous and cortical bone. *J Bone Miner Res* 11: 600-613
- Brånemark R., Öhrnell L.-O. (1997) Biomechanical characterization of osseointegration during healing: an experimental in vivo study in the rat. *Biomaterials* 18: 969-978
- Brewer H.B., Jr., Ronan R (1970) Bovine Parathyroid Hormone: Amino Acid Sequence. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 67: 1862-1869
- Bubeck, D. (1994) Der Einfluss von Hydrocortison Parathormon und 17 b-Estradiol auf die Collagen Typ I Synthese humaner Osteoblasten von Patienten mit postmenopausaler Osteoporose und Kontrollen. Dissertation, Universität Ulm
- Bucher O., Wartenberg H.(1997) Knochengewebe. In: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Hans Huber Verlag, Bern Göttingen Toronto Seattle, 12. Auflage, S 129-140
- Buckwalter J.A., Einhorn T.A., Bolander M.E., Cruess R.L.(1996) Healing of the musculoskeletal tissues. In: Rockwood C.A., Green D.P.(ed) Rockwood and Green's Fracture in adults, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 4th edn., Vol 1: p 261-277
- Buddecke E. (1994) Nebenschilddrüsenhormon (Parathormon, Parathyrin, PTH) In: Biochemie. de Gruyter-Verlag, Berlin (9.Auflage), S 323-325

- Canalis E., Centrella M. (1989) Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.* 83: 60-65
- Centrella, M., Canalis E. (1985). Transforming and non transforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7335-7339
- Centrella, M., Mc Carthy, T.L., Canalis E.(1987). Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262: 2869-2874
- Centrella, M., Mc Carthy, T.L., Canalis E.(1988). Parathyroid hormone modulates transforming growth factor ?activity and binding in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat parietal bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5889-5893
- Chapman M.W. (1987) Induction of fracture repair: Osteoinduction, Osteoconduction, and adjunctive care. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 81-85
- Chapman M.W. (1987) Prostaglandins and secondary injury phenomenon. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 87-93
- Cook S.D., Rueger D.C. (1996) Osteogenic protein-1:biology and applications.*Clin Orthop* 324:29-38
- Cosman F., Lindsay R. (1998) Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence. *Calcif Tissue Int* 62: 475-480
- Deetjen, Speckmann (1999) Knochen. In: *Physiologie*. Urban & Fischer, München Stuttgart Jena Lübeck Ulm, (3.Auflage), S 149-154
- Dempster D.W., Cosman F., Parisien M., Shen V., Lindsay R. (1993). Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocrine Rev* 14: 690-709
- Dobnig H., Turner R.T. (1995) Evidence that intermittend treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136/8: 3632-3638
- Duan Y. Luca, de V. (1999) Parathyroid hormone deficiency and excess: Similar effects on trabecular bone but differing effects on cortical bone. *J Clin Endocrinol Metab* 84/2: 718-722

- Duncan R.L., Turner C.H.(1995) Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 57:344-358
- Duvos C. (1995). Wirkung von Parathormon und Parathormonfragmenten auf Knochen- und Knorpelorgankulturen in vitro. *Naturwissensch. Dissertation, Technische Universität Braunschweig*
- Dyke, van D. (1967) Similarity in distribution of skeletal blood flow and erythropoietic marrow. *Clin Orthop* 52 : 37-51
- Einhorn T.A. (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 355S:S7-S21
- Ejersted C., Andreassen T.T., Hauge E.-M., Melsen F. and Oxlund H. (1995) Parathyroid hormone (1-34) increases vertebral bone mass, compressive strength, and quality in old rats. *Bone* 17/6: 507-511
- Ejersted C., Andreassen T.T., Nilsson M. (1994) Human parathyroid hormone (1-34) increases bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *Eur J Endocrinol* 130:201-7
- Ejersted C., Oxlund H., Andreassen T.T. (1997) Bisphosphonate maintains parathyroid hormone (1-34)-induced cortical bone mass and mechanical strength in old rats. *Calcif Tissue Int* 62:1-7
- Finnegan M.A., Uhthoff H.K. (1987) Healing of trabecular bone. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 33-37
- Friedenberg Z.B., Brighton C.T. (1987) Biophysical induction of fracture repair. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 75-80
- Frolik C.A., Cain R.L., Sato M., Harvey A.K. (1999) Comparison of recombinant human PTH (1-34) (LY333334) with a c-terminally substituted analog of human PTH-related protein (1-34) (RS-66271):In vitro activity and in vivo pharmacological effects in rats.*J Bone Miner Res*14/2:163-172
- Fujita T., Inoue T., Morii H., Morita R., Norimatsu H., Orimo H. Takahashi H.E.(1999) Effect of an intermittend weekly dose of human parathyroid hormone (1-34) on Osteoporosis: A randomized double-masked prospective study using three dose levels. *Osteoporos Int* 9:296-306
- Gasser J.A., Kneissel M., Thomsen J.S., Mosekilde L. (2000) PTH and interactions with bisphosphonates. *J Musculoskel Neuron Interact* 1:53-56

- Giannoukos G., Williams L.J.S., Chilco P.J., Abou-Samra A.B. (1999) Characterization of an element within the rat parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor gene promoter that enhances expression in osteoblastic osteosarcoma 17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 258:336-340
- Glimcher M.J. (1987) Chemistry, structure, and organization of bone and their influence on bone healing. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 39-47
- Goodman S.B., Lind M., Song Y., Smith R.L. (1998) In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clin Orthop Rel Res* 352:25-34
- Gunness-Hey M., Hock J.M. (1984) Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone. *Metab Bone Dis Relat Res* 4 (5): 177-81
- Halloran B.P., Bikle D.D., Harris J., Tanner S., Curren T. (1997) Regional responsiveness of the tibia to intermittent administration of parathyroid hormone as affected by skeletal unloading. *J Bone Miner Res* 12/7:1068-1074
- Harris W.H. (1994) Osteolysis and particle disease in hip replacement. *Acta Orthop Scand* 65(1): 113-123
- Heinrich G., Kronenberg H.M., Potts J.T., Habener J.F. (1984) Gene encoding parathyroid hormone. *J Biol Chem* 259, 3320-3329
- Hendrix R., Wixson R., Rana N., Rogers L. (1983): Arthrography after total hip arthroplasty: A modified technique used in the diagnosis of pain. *Radiology* 148: 647-652
- Hesch R.D., Busch U., Prokop M., Delling G., Rittinghaus E.F. (1989) Increase of vertebral density by combination therapy with pulsatile 1-38 hPTH and sequential addition of calcitonin nasal spray in osteoporotic patients. *Calcif tissue Int* 44: 176-80
- Hirano T., Burr D.B., Turner C.H., Sato M., Cain R.L., Hock J.M. (1999) Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res* 14/4:536-545
- Hock J.M., Fonseca J. (1990) Anabolic effect of human synthetic parathyroid hormone (1-34) depends on growth hormone. *Endocrinology* 127/4:1804-1810

- Hock J.M., Gera I.(1992) Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 7/1:65-72
- Hodsman A.B., Fraher L.J., Watson P.H. (1997). Parathyroid hormone: the clinical experience and prospects. In: Whitfield J.F., Morley P., Eds. *Anabolic Treatments of Osteoporosis*. Boca Raton, FL: CRC, 83-108
- Holt I., Davie M.W.J., Braidman I.P., Marshall M.J. (1994). Interleukin 6 does not mediate the stimulation by prostaglandin E<sub>2</sub>, parathyroid hormone, or 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of osteoclast differentiation and bone resorption in neonatal mouse parietal bones. *Calcif Tissue Int* 55: 114-119
- Holzer G., Majeska R.J., Lundy M.W., Hartke J.R., Einhorn T.A. (1999) Parathyroid hormone enhances fracture healing. *Clin Orthop* 366:258-263
- Howard G.A., Bottemiller B.L., Turner R.T. (1981) Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: Evidence for a coupling mechanism. *Proc Nat Acad Sci* 78/5: 3204-3208
- Ishizuya T., Yokose S., Hori M., Noda T., Suda T. (1997) Parathyroid hormone: Effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 99/12:2961-2969
- Jahng J.S., Kim H.W. (2000) Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Orthopedics* 23/10:1089-1094
- Jasty M., Goetz D.D., Bragdon C.R., Lee K.R., Hanson A.E., Elder J.R., Harris W.H. (1997) Wear of polyethylene acetabular components in total hip arthroplasty. *J Bone and Joint Surgery* 79-A/3: 349-358
- Jerome C.P., Johnson C.S., Lees C.J. (1995) Effect of treatment for 3 months with human parathyroid hormone 1-34 peptide in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 17: 415S-420S
- Junqueira (1996) Knochen und Knochenverbindungen. In: *Histologie*. Springer, Berlin u.a.(4.Auflage), S 190-217
- Jones J.I., Clemmons D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrin Rev* 16: 3-34



- Kadoya Y., Revell P.A., Kobayashi A., Al-Saffar N., Scott G., Freeman M.A.R. (1997) Wear particulate species and bone loss in failed total joint arthroplasties. *Clin Orthop Rel Res* 340: 118-129
- Kadoya Y., Kobayashi A., Ohashi H. (1998) Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand* 278(69): 1-16
- Keutmann H.T., Sauer M.M., Hendy G.N., O'Riordan J.L.H., Potts J.T. (1978) Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry* 17, 5723-5729
- Kienapfel H., Summer D.R., Turner T.M., Urban R.M., Galante J.O.(1992) Efficacy of autograft and freeze-dried allograft to enhance fixation of porous coated implants in the presence of interface gaps. *J Orthop Res* 3(10): 423-433
- Kienapfel H. (1994) *Grundlagen der zementfreien Endoprothetik*. Gräfeling Demeter Verlag
- Kienapfel H., Sprey C., Wilke A., Griss P. (1999) Implant fixation by bone ingrowth. *J Arthroplasty* 14/3:355-368
- Kimmel D.B. (1996). Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. In: *Osteoporosis*. (eds.) Markus R., Feldman D., Kelsey J.; San Diego: Academic Press; p 671-680
- Kitsugi T., Nakamura T., Oka M., Yan W.-Q., Goto T., Kokubo T., Miyaji S.(1996) Bone-bonding behavior of titanium and its alloys when coated with titanium oxide and titanium silicate. *J Bone Joint Surg* 32:149-156
- Kornak U., Dellling G., Mundlos S. (2003). Melkulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 100, Heft 19, Mai 2003
- Kroll M.H.(2000) Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. *Bull Math Biol* 62:163-187
- Lane J.M., Werntz J.R. (1987) Biology of fracture healing. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 49-59
- Leaffer D., Sweeney M., Kellermann L.A., Avnur Z. (1995) Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology* 136/8: 3624-3631

- Lee K., Deeds J.D., Chiba S., Un-No M., Bond A.T., Segre G.V.(1994). Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: In situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 134: 441-450
- Li X. J., Jee W.S., Ke H.Z., Mori S., Akamine T. (1991). Age-related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Cells and Materials* 1: S25-S35
- Li P., Ohtsuki C., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N., Groot K.(1994)The role of hydrated silica, titania and alumina in inducing apatite on implants.*J Biomed Mater Res* 28:7–15
- Li M., Liang H., Shen Y., Wronsky T.J. (1999) Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone* 24/2:95-100
- Liang J.D., Hock J.M., Sandusky G.E., Santerre R.F., Onyia J.E. (1999) Immunohistochemical localization of selected early response genes expressed in trabecular bone of young rats given hPTH 1-34. *Calcif Tissue Int* 65: 369-373
- Lind M., Overgaard S., Nguyen T., Ongpipattanakul B., Bunger C. et al.(1996)Transforming growth factor-beta stimulates bone growth.Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs.*Acta Orthop Scand* 6(67):611-616
- Linder L., Lindberg L., Carlsson A. (1983) Aseptic loosening of hip prostheses. *Clin Orthop Rel Res* 175: 93-104
- Lindsay R., Nieves J., Formica C., Hennemann E., Woelfert L. (1997) Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *The Lancet* 350/23:550-555
- G. Löffler, P.E.Petrides (1998) Hormone des Calcium und Phosphatstoffwechsels. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, (6.Auflage), S. 858–862
- G. Löffler, P.E.Petrides (1998) Pathobiochemie der extrazellulären Matrix. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin (6.Auflage), S. 749–752
- Mackey M.S., Stevens M.L., Ebert D.C., Tressler D.L., Combs K.S., Lowry C.K., Smith P.N., Mc Osker J.E. (1995) The ferret as a small animal model with BMU-based remodeling for skeletal research. *Bone* 17:191S-196S

- Mahoney C.A., Nissenson R.A., Sarnacki P., Pua K. (1983). Canine renal receptors for parathyroid hormone. Downregulation in vivo by exogenous PTH. *J Clin Invest* 72: 411-421
- Marks S.C., Popoff S.N. (1988) Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anatomy* 183: 1-44
- McClelland P., Onyia J.E., Miles R.R., Tu Y., Liang J., Harvey A.K. (1998) Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem* 70:391-401
- Merz W.A., Schenk R.K. (1970) Quantitative structural analysis of human cancellous bone. *Acta Anat* 75: 54-66
- Mjöberg B. (1994) Theories of wear and loosening in hip prostheses. *Acta Orthop Scand* 65 (3):361-371
- Mjöberg B. (1997) The theory of early loosening of hip prostheses. *Orthopedics* 20 (12):1-7
- Mohan S., Kutilek S., Zhang C., Shen H.G., Kodama Y., Srivastava A.K. (2000) Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone (1-34), (1-31), and (2-34) in Mice. *Bone* 27/4: 471-478
- Murray D.W., Rushton N. (1990) Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J Bone Joint Surg* 72-B: 988-992
- Nakajima A., Shimoji N., Shiomi K., Shimizu S., Moriya H., Einhorn T., Yamazaki M. (2002) Mechanisms for the Enhancement of Fracture Healing in Rats Treated With Intermittent Low-Dose Human Parathyroid Hormone (1-34). *J Bone Min Res* 17/11: 2038-47
- Niall H.D., Keutmann H.T., Sauer R.T., Hogan M.L., Dawson B.F., Aurbach G.D., Potts J.T. (1970) The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 1586-1588
- Nishida S., Yamaguchi A., Tanizawa T., Endo N., Mashiba T. (1994) Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone* 15/6:717-723

- Onyia J.E., Bidwell J., Herring J., Hulman J., Hock J.M. (1995) In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone* 17/5:479-484
- Oxlund H., Ejersted C., Andreassen T.T. (1993) Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum. *Calcif Tissue Int* 53:394-399
- Potts J.T., Kronenberg H.M. (1982) Parathyroid Hormone: Chemistry, Biosynthesis, and mode of Action. In: *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, Inc. (Vol. 35), pp 323-395
- Pun K.K., Ho P.W.M., Nissenson R.A., Arnaud C.D. (1990) Desensitization of parathyroid hormone receptors on cultured bone cells. *J Bone Miner Res* 5: 1193-1200
- Raschke M.J., Bail H., Windhagen H.J., Kolbeck S.F., Weiler A., Raun K., Kappelgard A. (1999) Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 24/2: 81-88
- Reeve J., Meunier P.J., Parsons J.A., Bernat M., Bijvoet O.L.M., Courpron P., et al. (1980) Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *BMJ* 280: 1340-44
- Reeve J., Arlot M., Bernat M., Edouard C., Hesp R., Slovik D., et al. (1980) Treatment of osteoporosis with human parathyroid hormone fragment 1-34: a positive final tissue balance in trabecular bone. *Metab Bone Dis Rel Res (Suppl)* 2: 355-60
- Reeve J., Arlot M., Bernat M., Charhon S., Edouard C., Slovik D., et al. (1981) Calcium-47 kinetic measurement of bone turnover compared to bone histomorphometry in osteoporosis: the influence of human parathyroid fragment (hPTH 1-34) therapy. *Metab Bone Dis Rel Res* 3: 23-30
- Robertson O., Wingstrand H., Kesteris U., Jonsson K., Önnarfält R. (1997) Intracapsular pressure and loosening of hip prostheses. *Acta Orthop Scand* 68 (3): 231-234
- Rodan G.A., Martin T.J. (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508-1514
- Russel R.G.G., Bunning R.A.D., Hughes D.E., Gowen M. (1990) Humoral and local factors affecting bone formation and resorption. In: *Stevenson J.C. New techniques in metabolic bone disease*. Wright, London, P 1-25

- Ryd L (1992) Roentgen stereophotogrammetric analysis of prosthetic fixation in the hip and knee joint. *Clin Orthop* 276: 56-65
- Ryd L., Albrektsson B.E., Carlsson L., Dansgard F., Herberts P., et al. (1995) Roentgen stereophotogrammetric analysis as a predictor of mechanical loosening of knee prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 3 (77): 377-83
- Santavirta S., Xu J.W., Hietanen J., Ceponis A., Sorsa T., Kontio R., Konttinen Y.T. (1998) Activation of periprosthetic connective tissue in aseptic loosening of total hip replacements. *Clin Orthop Rel Res* 352:16-24
- Sauer R.T., Niall H.D., Keutmann H.T., Hogan M.L., Dawson B.F., O’Riordan J.L.H., Potts J.T. (1974) The amino acid sequence of porcine parathyroid hormone. *Biochemistry* 13, 1994-1999
- Schenk R.K. (1987) Cystodynamics and histodynamics of primary bone repair. In: Lane J.M. (Hrsg) *Fracture Healing*. Churchill Livingstone, p 23-31
- Seeman E., Tsalamandris C., Bass S., Pearce G. (1995) Present and future of osteoporosis therapy. *Bone* 17/2: 23S-29S
- Selye H. (1932) On the Stimulation of New Bone-Formation with Parathyroid Extract and Irradiated Ergosterol . *Endocrinology* 16: 547-558
- Shanbhag A.S., Jacobs J.J., Black J., Galante J.O., Glant T.T. (1997) Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. *Clin Orthop* 342: 205-217
- Sietsema W.K.(1995). Animal models of cortical porosity. *Bone* 17: 297S-305S
- Simon S.R.(1994) *Orthopaedic basis science*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont
- Skripitz R., Andreassen T.T., Aspenberg P. (2000) Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. *J Bone Joint Surgery* 82-B (1):138-141
- Skripitz R., Andreassen T.T., Aspenberg P. (2000) Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone. *Acta Orthop Scand* 71 (6): 619-624
- Skripitz R. (2001) Parathyroid hormone for bone repair and implant fixation. Doctoral dissertation, Department of Orthopedics, Lund University Hospital, Lund, Sweden

- Skripitz R., Aspenberg P. (2001) Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. *Clin Orthop (US)* (392): 427–32
- Skripitz R., Aspenberg P. (2001) Implant fixation enhanced by intermittent parathyroid hormone treatment. *J Bone Joint Surg (Br)*. 83 (3): 437–40
- Skripitz R., Aspenberg P. (2001) Parathyroid hormone (1-34) increases attachment of PMMA cement to bone. *J Orthop Science (Japan)* 6 (6): 540–44
- Slovik D.M., Rosenthal D.I., Doppelt S.H., Potts J.T. Jr., Daly M.A., Campbell J.A., Neer R.M. (1986) Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Bone Miner Res* 1: 377-81
- Södermann P. (2000) On the validity of the results from the Swedish National Hip Arthroplasty register. *Acta Orthop Scand* 296 (71):1-33
- Summer D.R., Turner T.M., Purchio A.F., Gombotz W.R., Urban R.M. et al.(1995) Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *J Bone Joint Surg Am* 8(77):1135-1147
- Tam C.S., Heersche J.N.M., Murray T.M., Parsons J.A. (1982). Parathyroid hormone stimulates the bone appositions rate independently of its resorptive action: Differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* 110: 506-512
- Tomlinson S., Hendy G.N., Pemberton D.M., O’Riordan J.L.H. (1976). Reversible resistance to the renal action of PTH in man. *Clin Sci Mol Med* 51: 59-69
- Turner C.H., Wang T., Hirano T., Burr D.B., Hock J.M., Hotchkiss C.E. (1999) In monkeys treatment with PTH (1-34), LY333334, increases bone strength in lumbar vertebrae and the femoral neck without compromising cortical bone strength. Freund Publishing House Ltd.
- Pun K.-K., Ho P.W.M., Nissenson R.A., Arnaud C.D. (1990). Desensitization of parathyroid hormone receptors on cultured bone cells. *J Bone Miner Res* 5: 1193-1200
- Qi, H., Li, M., Wronski T.J. (1994). A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged, ovariectomized rats. *J Bone Miner Res [Suppl 1]* 9:S8 (Abstract)

- Vis, van der H.M.(1997) *Wear, particles and physical factors in loosening of hip prostheses.* Thesis Publishers, Amsterdam, pp 1-132
- Vis, van der H.M., Aspenberg P., Kleine, de R., Tigchelaar W. (1998) Short periods of oscillating fluid pressure directed at a titanium-bone interface in rabbits lead to bone lysis. *Acta Orthop Scand* 69 (1):5-10
- Vis, van der H.M., Aspenberg P., Marti R.K., Tigchelaar W., Noorden, van C.J.F. (1998) Fluid pressure causes bone resorption in a rabbit model of prosthetic loosening. *Clin Orthop Rel Res* 350:201-208
- Wang, B.C., Lee T.M., Chang E., Yang C.Y.(1993)The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone:the effect of coating thickness.*J Biomed Mater Res* 10(27):1315-1327
- Watson P.H., Fraher L.J., Kiesel M., DeSousa D., Hendy G. (1999) Enhanced osteoblast development after continuous infusion of hPTH (1-84) in the rat. *Bone* 24/2:89-94
- Waynforth H.B., Flecknell P.A. (2001) *Experimental and surgical technique in the rat.* Academic Press, San Diego, Calif.: P 1-358
- Zhang L., Takahashi H.E., Inoue J., Tanizawa T., Endo N., Yamamoto N., Hori M. (1997) Effects of intermittent administration low dose human PTH (1-34) on cancellous and cortical bone of lumbar vertebral bodies in adult beagles. *Bone* 21/6:501-506

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Rüter für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und für alles mir im praktischen Jahr Beigebrachte.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Dr. R. Skripitz für die gute Zusammenarbeit, die ausführlichen Korrekturen meiner Erstentwürfe sowie das Ermöglichen einer Studiauswertung in Schweden und der Teilnahme am Orthopädenkongress Berlin. Ich wünsche ihm für seine private und berufliche Zukunft alles erdenklich Gute und hoffe, dass wir auch nach Abschluss dieser Arbeit in Kontakt bleiben.

Herrn Prof. Dr. P. Aspenberg und seinen wissenschaftlichen Mitarbeitern B. Skoglund, A. Fahlgren, A. Sudeifi, I. Mårtensson danke ich für die Durchführung der histologischen Schnitte und Färbungen, die Anleitung und Hilfe bei der histomorphometrischen Auswertung sowie das geduldige Beantworten zahlreicher E-Mails bezüglich meiner Arbeit (Thank you, Björn!).

Ich danke Mimiko für die stete Hilfsbereitschaft zur Herstellung der Injektionslösungen.

Herrn Dr. P. Seidel danke ich für die Anfertigung der PMMA-Stäbe, ebenso Frau Koehn und Herrn Meinck von der Hochschule Zittau für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder der Implantate bzw. der Roughness-Messung.

J. Link und S. Rusche danke ich vielmals für die Hilfe bei allen technischen Problemen beim Schreiben meiner Doktorarbeit sowie für deren Formatierung.

Schließlich möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, dass sie mir eine Schulausbildung zukommen ließen, die diese Arbeit erst ermöglicht hat sowie meinen Geschwistern und meinem Ehemann für stetige seelisch-moralische Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.



## **Erklärung**

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

*Ort, Datum, Unterschrift*

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Silvia Anna-Gretha Röpke, geb. Böhling  
geb. am 26.12.1977 in Herzberg am Harz

## **Schulbildung**

1984-1988	Grundschule Zorge
1988-1997	Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa

## **Studium**

seit Okt. 1998	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Sept. 2000	Physikum
Sept. 2001	1. Staatsexamen
Sept. 2003	2. Staatsexamen
Dez. 2004	3. Staatsexamen

Hamburg, den 9. Oktober 2005