

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
Zentrum für Operative Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. W. Rüter

Untersuchungen zum Einwachsverhalten von PMMA

(Polymethylmethacrylat)-Zement und

Edelstahlimplantaten bei

einmaliger Gabe von osteogenetischen Faktoren

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin im Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg vorgelegt

von

John Markworth

aus
Hamburg

Hamburg, 2005

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

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	8
2. Einleitung	10
2.1. Knochenstoffwechsel	10
2.1.1. Funktion des knöchernen Skeletts	10
2.1.2. Knochenzellen	11
2.1.3. Remodeling	16
2.1.4. Knochenbildung, Knochenwachstum und Knochenformen	19
2.1.5. Knochenheilung	
2.2. Parathormon.....	26
2.2.1. Struktur und Biosynthese	26
2.3. Bisphosphonate	31
2.3.1. Struktur und Pharmakokinetik von Bisphosphonaten	32
2.3.2. Wirkung und Funktion von Bisphosphonaten.....	33
2.4. Implantate und Osseointegration	37
2.4.1. Implantatverankerung	38
3. Material und Methoden	40
3.1. Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht.....	40
3.2. Genehmigung des Tierversuchs.....	40
3.3. Tierhaltung und Ernährung.....	40
3.4. Versuchsaufbau.....	40
3.5. Geräte	41
3.6. Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	42
3.7. Herstellung der Injektionslösungen	43
3.8. Herstellung der Implantate	43
3.9. Implanatation der Stahlschrauben und PMMA-Zementstäbe	45
3.10 Mechanische Tests	48
3.11.Histologische Untersuchung	50
3.12. Histomorphometrische Auswertung der Ergebnisse.....	52
3.13. Auswertung und Statistik.....	59
3.14. Bestimmen des Ash-weights.....	59

4. Ergebnisse	60
4.1. Ergebnisse: Implantat-Knochen-Kontakt	60
4.2. Ergebnisse: Knochendichte.....	64
4.3. Ergebnisse: Mechanische Stabilität.....	66
4.4. Ergebnisse: Ash-weight.....	69
5. Diskussion	71
5.1. Studien zum Einwachsverhalten von PMMA- und Stahlschrauben- Implantaten unter intermittierender PTH- oder Bisphosphonat-Gabe	72
5.2. Der anti-resorptive(katabole) Effekt von Bisphosphonaten	73
5.3. Anabole Eigenschaften von Parathormon	77
6. Zusammenfassung	81
7. Literaturverzeichnis	83
Danksagung	91
Lebenslauf	92
Eidesstaatliche Versicherung	93

Abbildungsverzeichnis

1. Entwicklung der unterschiedliche Knochenzellen	11
2. Remodeling	18
3. Desmale Ossifikation	21
4. Perichondrale und enchondrale Knochenbildung	22
5. Zonen der chondralen Ossifikation	23
6. Sekundäre Knochenheilung	25
7. Das Prä-Pro-PTH-Gen und die Prozessierung seines Transkriptions- und Translationsproduktes.....	27
8. Strukturformeln	33
9. Stahlschrauben-Implantat	44
10. Implantation der Stahlschrauben.....	46
11. Schema des implantierten PMMA-Zementstabes	46
12. Kontaktradiographie der Tibiae mit implantierten Stahlschrauben	48
13. Moduläres Prüfsystem ZWICK® Z 2.5	49
14. Fixierte Stahlschraube vor Durchführung des Pull-out-Versuchs	49
15. Arbeitsplatz für histomorphometrische Analysen.....	52
16. Schema zur Messung des Implantat-Knochen-Kontaktes.....	53
17. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)	54
18. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)	54
19. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)	55
20. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)	55
21. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)	56
22. Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (20-fache Vergrößerung)	56
23. Merz-Grid	59
24. Diagramm der Werte des Implantat-Knochen-Kontaktes	61
25. Diagramm der volumetrischen Knochendichtewerte.....	64
26. Diagramm der Pull-out-Versuchswerte.....	66
27. Diagramm der Ash-weight-Werte.....	69

Tabellenverzeichnis

1. Effekte verschiedener Faktoren auf den Knochenumbau.....	15
2. Vorkommen von Rezeptoren für Parathormon.....	31
3. Behandlungsschema der Versuchsgruppen	41
4. Ergebnisse der Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes	62
5. Ergebnisse der Auswertung durch die Statistiksoftware StatView®.....	63
6. Ergebnisse der Auswertung durch Fisher´s PLSD-Test.....	63
7. Ergebnisse der Knochendichtebestimmung.....	65
8. Ergebnisse der Pull-out-Versuche.....	67
9. Ergebnisse der Auswertung durch die Statistiksoftware StatView®.....	68
10. Ergebnisse der Ash-weight-Bestimmung	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bisphosph.	Bisphosphonat
BCC	Bone Conduction Chamber
BMC	Bone Mineral Content
BMP	Bone Morphogenetic Protein
C	Kohlenstoff
CA	Carboanhydrase
Ca ²⁺	Calcium
Ca ²⁺ /PKC-System	Kalzium/Proteinkinase C-System
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP/PKA- System	cyclisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A-System
CIN	Chronisch Idiopathische Neutropenie
Co ₂	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hPTH	humanes Parathormon
HWZ	Halbwertszeit
IEG	Immediate Early Genes
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
ksv	Dichtekoeffizient

LIF	Lymphocyte Inhibiting Factor
μg	Mikrogramm
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
M-wert	Mittelwert
N	Stickstoff
[N]	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OH ⁻	Hydroxidgruppe
OPG	Osteoprotegerin
P	Phosphor
PMMA	Polymethylmethacrylat (Knochenzement)
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related Protein
R	Seitenkette eines chemischen Moleküls
R _a	Oberflächen-Roughness
RANK	receptor activator of nuclear factor Kappa β
RANKL	receptor activator of nuclear factor Kappa β ligand
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RSA	radiostereometrische Analyse
s	Standardabweichung
S _v	Oberflächendichte
S/V	Spezifische Oberfläche
Tab.	Tabelle
Ti	Titanium
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (Beta)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRANCE	Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
TRAP	Trap Resistant Acid Phosphatase
V _v	Volumetrische Dichte
WHO	World Health Organization

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Bildung eines direkten Kontaktes zwischen prothetischem Knochenimplantat und Knochen ist essentiell für die Primärstabilität. Die Primärstabilität eines prothetischen Knochenimplantates in den ersten sechs postoperativen Monaten ist wiederum klinisch von entscheidender Bedeutung für die potentielle Lockerung der Prothese fünf bis acht Jahre später (1, 2)

In Schweden ist es beispielsweise nach 84.884 primären Hüftgelenkoperationen (zwischen 1986 und 1994) bei 10.176 (=12%) Patienten im Anschluss zu Prothesenlockerung oder Materialversagen gekommen, so dass sich 12% der Patienten im Jahre 1996 einer Revisionsoperation unterziehen mussten (3).

Die Optimierung des Implantat-Knochen-Kontaktes mit dem Ziel spätere Revisionsoperationen zu verhindern ist deswegen Gegenstand der chirurgisch-orthopädischen Implantationsforschung. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Osseointegration eines Implantates sich unter intermittierender Gabe von Parathormon oder Bisphosphonaten signifikant verbessert und sich somit positiv auf die Primärstabilität auswirkt (4-7). Parathormon wirkt anabol auf den Knochen über Osteoblastenstimulation, wohingegen Bisphosphonate anti-katabol über eine Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten wirken.

In den bisherigen Untersuchungen wurden entweder Parathormon oder Bisphosphonate intermittierend über einen Zeitraum von 2 Wochen bis hin zu 6 Monaten systemisch appliziert. In dieser Studie soll untersucht werden, inwiefern sich die nur *einmalige* Gabe von Parathormon oder Bisphosphonat, entweder perioperativ oder 48 Stunden postoperativ, auf das Implantateinwachsverhalten auswirkt. Die Effekte beider Therapieansätze wurden histomorphometrisch und mechanisch untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

- Kann die *einmalige* Gabe von Parathormon oder Bisphosphonat die periimplantäre Knochendichte erhöhen?
- Verbessert sich durch *einmalige* Gabe von Parathormon oder Bisphosphonat der Kontakt zwischen Knochen und PMMA-Zement-Implantat?
- Verbessert sich die Primärstabilität von Stahlschrauben-Implantaten mechanisch auch durch die *einmalige* Gabe von Parathormon oder Bisphosphonat?

- Welche Unterschiede bestehen zwischen Parathormon oder Bisphosphonat bei *einmaliger* Gabe in bezug auf die Verbesserung der Knochendichte, des Implantat-Knochen-Kontaktes und der Primärstabilität?

2. Einleitung

2.1 Knochenstoffwechsel

2.1.1 Funktion des knöchernen Skeletts

Die Knochenmatrix des menschlichen Skeletts besteht aus spezialisierten Zellen, mineralisierter und nicht mineralisierter Knochengrundsubstanz, dem Osteoid, sowie Blutgefäßen und Nervenfasern. Das menschliche Skelett hat sowohl strukturelle als auch metabolische Funktionen. Die strukturelle Funktion ist bedeutsam für Motorik, Atmung und Schutz der inneren Organe. Zwischen dem Skelett und haemopoetischen System besteht eine strukturelle Verbindung über die Zellen und die lokalen Regulationsfaktoren, welche sich beide Systeme teilen.

Die metabolische Funktion des Skeletts besteht im wesentlichen in der Fähigkeit Calcium, Phosphat und Kalksalze speichern zu können und so einen großen Beitrag am Calciumstoffwechsel zu leisten. Der menschliche Organismus speichert ca. 25 Mol Calcium, wovon 99 % im knöchernen Skelett und in den Zähnen in Form von Hydroxylapatit gespeichert sind. Eine Anpassung des Calcium-Stoffwechsels an die jeweiligen Bedürfnisse ist durch Knochenanbau bzw. -abbau möglich. Zusätzlich kann das knöcherne Skelett aufgrund seiner großen Oberfläche Toxine und Schwermetalle binden und so deren zellschädigende Wirkung auf andere Organe minimieren.

2.1.2 Knochenzellen

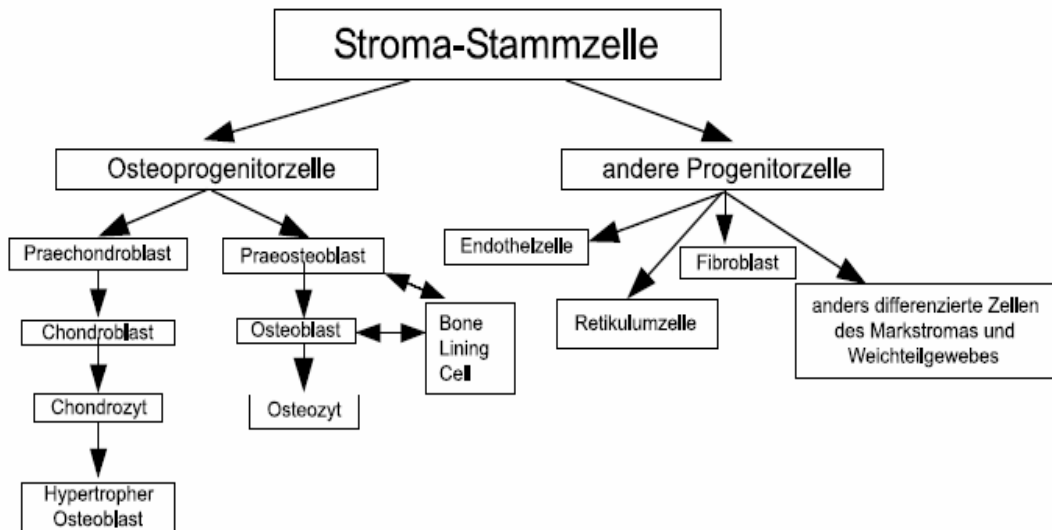


Abb. 1: Entwicklung der unterschiedlichen Knochenzellen (aus: Marks, Popoff, 1988, S. 20)

Osteoblasten (siehe Abb.1)

Osteoblasten entstehen unter dem Einfluss von Parathormon, der Nebenschilddrüse und Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) aus mesenchymalen Stammzellen. Diese mesenchymalen Stammzellen sind zu Beginn ihrer Entwicklung pluripotent und können sich ebenso in Muskelzellen, Fettzellen, Knorpelzellen oder fibröse Bindegewebszellen differenzieren.

Bei Precursor-Zellen handelt es sich um teilweise differenzierte Zellen, die sich nur in Osteoblasten weiterentwickeln können. Zellen dieser Population findet man im Knochenmark sowie im Periost. Unter bestimmten Bedingungen können diese Zellen aber auch zu Fettzellen differenzieren, was einen verschlechterten Knochenaufbau begründen könnte (8).

Osteoblasten sind die knochenbildenden Zellen. Sie produzieren und sezernieren neben alkalischer Phosphatase und Wachstumsfaktoren, wie z.B. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Osteocalcin, hauptsächlich Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine. Sie bilden das anfänglich noch weiche, unverkalkte Osteoid, die Knochengrundsubstanz. Erst durch Einlagerung von

anorganischen Kalksalzen, wie Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat, in die organische Grundsubstanz erhält das Osteoid die für Knochen charakteristische Härte. Vollständig differenzierte Osteoblasten ordnen sich nebeneinander auf der Knochenoberfläche an und sezernieren die oben genannten organischen Substanzen.

Durch zunehmende Osteoidbildung und folgende Einlagerung von Kalksalzen mauern sich einige wenige Osteoblasten selbst ein und werden zu Osteozyten. Um einen ständigen Fluss von Ionen und kleinen Molekülen aufrechterhalten zu können, sind Osteoblasten und Osteozyten über Zytoplasmfortsätze in Canaliculi, kleinste Kanälchen in der Knochenmatrix, und gap junctions mit- und untereinander verbunden. Eine wichtige Aufgabe dieses Syncytium von verbundenen Zellen ist neben der Ernährung das „sensing“ von mechanisch einwirkenden Kräften. Dabei wirken Scherkräfte auf Canaliculi und Lakunen, die die Osteozyten umgeben. Der Hauptteil der Osteoblasten bleibt an der Knochenoberfläche und entwickelt sich entweder zu abgeflachten bone lining cells, welche mit den Osteozyten verbunden bleiben, oder begibt sich in den programmierten Zelltod, die Apoptose. Die Lebensdauer eines Osteoblasten beträgt ca. 200 Stunden (9).

Osteoblasten besitzen verschiedene Rezeptoren für Faktoren, die den Knochenumbau beeinflussen: Rezeptoren für Parathormon, Calcitriol, Glukokortikoide, Geschlechtshormone, Wachstumshormone und Schilddrüsenhormone; außerdem Rezeptoren für IL-1, TNF- α , Prostaglandine, Insulin-like growth factor (IGFs), bone morphogenetic proteins (BMP 1-12) und einige andere Faktoren. Zum Teil werden diese Faktoren in inaktivierter Form in die Knochenmatrix eingebaut und können dann später bei Knochenumbau oder –verletzung durch Enzyme aktiviert werden.

Osteozyten

Osteozyten entwickeln sich aus den von Knochengrundsubstanz umgebenen Osteoblasten. Direkt um die Osteozyten ist die Mineralisation der Knochenmatrix gehemmt, was zur Bildung von typischen Lakunen führt. Entlang der vielen langen Zytoplasmfortsätze, über die Osteozyten mit Osteoblasten und bone lining cells

verbunden sind, findet der Ionen- und Molekülaustausch statt. Ionen und Moleküle können so im Knochen über weite Strecken transportiert werden. Im Vergleich zu Osteoblasten besitzen die Osteozyten eine sehr viel geringere Syntheseaktivität. Hierauf deutet auch ihre geringere Ausstattung mit Zellorganellen, wie raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und Golgi-Apparat hin.

Bone lining cells

Diese, aus reifen Osteoblasten entstandenen, Zellen liegen nebeneinander auf der Knochenoberfläche und sind über gap-junctions mit Osteozyten und untereinander verbunden. Ihr flacher, länglicher Zelleib enthält wenig Zellorganellen, was auf ihre sehr geringe Syntheseleistung hinweist. Wahrscheinlich handelt es sich um Progenitor-Zellen der Osteoblasten, die im Bedarfsfall zu Osteoblasten differenzieren können (10).

Bone lining cells sollen sowohl der Regulation der Knochenmineralisierung dienen, als auch an der Schutzbarriere zwischen Knochengewebe und anderer extrazellulärer Matrix beteiligt sein (11).

Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die reich an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER), Golgi-Apparat, Lysosomen und Mitochondrien sind, was auf ihren hohen Energieverbrauch hinweist. Sie liegen in sogenannten „Howship“-Lakunen, durch Knochenresorption entstandene Einbuchtungen. Ihre Lebenszeit beträgt ca. 20 bis 30 Tage. Auf ihrer, dem Knochen zugewandten Seite, besitzen sie eine kammartig gefaltete Membran, welche die knochenresorbierende Oberfläche um ein vielfaches vergrößert. Sie wird „ruffled border“ genannt. Diese ruffled border wird seitlich von einer nahezu zellfreien Zytoplasmazone begrenzt, die sich an die Knochenoberfläche anbindet und das saure Resorptionskompartiment (pH 3,5) abschließt: der „clear-zone“ oder besser „sealing zone“ (12). Osteoklasten synthetisieren Enzyme, wie z.B. saure Phosphatase (TRAP = Trap Resistant Acid Phosphatase) und saure Hydrolasen, die sie in den Bereich der ruffled border sezernieren.

Diese beiden Enzyme katalysieren die Bildung von Wasserstoff(H)-Ionen und senken so den pH-Wert im Resorptionskompartiment auf 3,5. Ein so niedriger pH-Wert erhöht die Löslichkeit der verkalkten Knochenmatrix und bietet den sauren Hydrolasen ein optimales Milieu zur Lyse der organischen Bestandteile (13).

Zur Entwicklung von Osteoklasten gibt es 3 unterschiedliche Theorien:

Theorie 1: Man nahm an, dass sie durch Verschmelzung von Makrophagen und Monozyten entstehen. Diese Theorie konnte jedoch widerlegt werden.

Theorie 2: Osteoklast und Makrophag/Monozyt stammen von einer gemeinsamen „Ur“-Zelle, z.B. einem Promonozyt ab.

Theorie 3: Heutzutage geht man davon aus, dass Osteoklast und Makrophag/Monozyt von einer pluripotenten haemopoetischen Stammzelle abstammen, ihre Zelllinien aber vollends unabhängig voneinander verlaufen (11).

Um die Genese der Osteoklasten-Progenitorzellen zu initiieren wird macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) benötigt, der wahrscheinlich von Osteoblasten gebildet wird (14). Diese Zellen findet man im Mark, in der Milz und vereinzelt auch im Blutkreislauf.

Ein einzelner Osteoklast ist in der Lage die 100- bis 150-fache Menge an Knochensubstanz abzubauen, die ein Osteoblast in derselben Zeit aufzubauen fähig ist. Deshalb muss das Gleichgewicht von Knochenan- und -abbau über effiziente Kontrollmechanismen geregelt werden.

Bei beispielsweise einer leichten Erhöhung des Serumcalciumspiegels wird Calcitonin von C-Zellen der Schilddrüse an die Blutbahn abgegeben und die Osteoklastentätigkeit innerhalb weniger Minuten gesenkt.

Sinkt der Serumcalciumspiegel dagegen leicht ab, wird die Osteoklastenaktivität über Botenstoffe, die in Osteoblasten synthetisiert werden, gesteigert.

Beispiele für diese Botenstoffe sind Prostaglandin E₂ und Zytokine, die nach Bindung von Parathormon an den Osteoblast sezerniert werden. Da Osteoklasten selbst keinen Rezeptor für Parathormon besitzen, erfolgt ihre Aktivierung indirekt über Zell-Zellkontakt von Osteoblast mit Osteoklast (15). Osteoblasten besitzen einen Faktor RANKL (Receptor Activator of NF-Kappa B Ligand), mit dem sie an einen RANK-Rezeptor auf dem Osteoklasten bzw. der Osteoklast-Progenitorzelle binden. Es kommt zur Aktivierung, Migration und Differenzierung der

Osteoklast-Progenitorzelle zum Osteoklast und darüber zur Knochenresorption. RANKL ist identisch mit dem auf T-Zellen und dendritischen Zellen zu findenden Faktor TRANCE (tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine) (16). Bei Oestrogenmangel scheint der gesteigerte Knochenabbau unter anderem auf einer UP-Regulation der RANK-Liganden auf Knochenmarkzellen zurückzuführen zu sein (17).

Botenstoffe, die den Zell-Zellkontakt von Osteoblast und Osteoklast hemmen, sind z.B. Osteoprotegerin (OPG) und IL-18, die beide u.a. von Osteoblasten synthetisiert werden (Tabelle1). OPG bindet auch an RANKL, führt aber zu keiner Steigerung der Osteoklastenaktivität (16).

Tab. 1 : Effekte verschiedener Faktoren auf den Knochenumbau

	Knochen- resorption	Knochen- bildung
IL-1	-	+
IL-4	-	-
IL-6	+	+
IL-7	+	
IL-11	+	+
IL-13	-	
IL-18	-	
TNF α	+	-
LIF	-	+
IFN γ	-	-

+ = stimuliert Osteoklasten

- = inhibiert Osteoklasten

IL = Interleukin

TNF α = Tumornekrosefaktor alpha

LIF = Lymphozyten inhibierender Faktor

IFN γ = Interferon gamma

2.1.3 Remodeling

Das knöcherne Skelett unterliegt ständigen Umbauvorgängen, wobei die Gesamtknochenmasse, abgesehen vom physiologischen Altersverlust an Knochenmasse, konstant bleibt. Das Skelett eines erwachsenen Menschen wird im Schnitt alle 10 Jahre einmal vollständig erneuert (18). Es wird angenommen, dass der Remodeling –Zyklus 2 – 4 Wochen benötigt, um ein Stück Knochensubstanz abzubauen, und 3 – 4 Monate, um dieses wieder aufzubauen bzw. zu remodeln(19). Nach einem Modell von Frost wird das Remodeling, der Knochenumbau, in 5 Phasen unterteilt (siehe auch Abb.2):

1. *Initiation*

Ein Impuls ändert den Zustand der sich nicht im Umbau befindlichen Knochenoberfläche. Dadurch verändern sich Osteozyten, bone lining cells und Prä-Osteoblasten in ihrer Form und initiieren so einen Remodeling-Zyklus.

2. *Aktivation*

Osteoklasten stellen als Antwort auf den Initiationsreiz Enzyme, z.B. Katalasen, zur Resorption bereit.

3. *Resorption (ca. 2 Wochen)*

Resorption der organischen und anorganischen Matrix durch Osteoklasten. Es wird angenommen, dass dieser Vorgang durch hohe lokale Konzentrationen von Calcium, wie sie beim Knochenabbau entstehen, limitiert wird (20)

4. *Reversal (Umschaltphase, 4-5 Wochen)*

Ende der Resorption und Vorbereitung der Knochenoberfläche fürs Remodeling durch Osteoblasten. Eine glykoproteinreiche Schicht, die „cement-line“, legt sich über die resorbierte Knochenoberfläche. An diese haften sich die Osteoblasten an.

5. *Formation (16 Wochen)*

Der entstandene Defekt wird mit Osteoid aufgefüllt und die Mineralisation beginnt. Die Knochenoberfläche ist wieder mit bone lining cells bedeckt, und die Zellen begeben sich in eine Phase verminderter Zellaktivität bis ein neuer Remodeling-Zyklus beginnt.

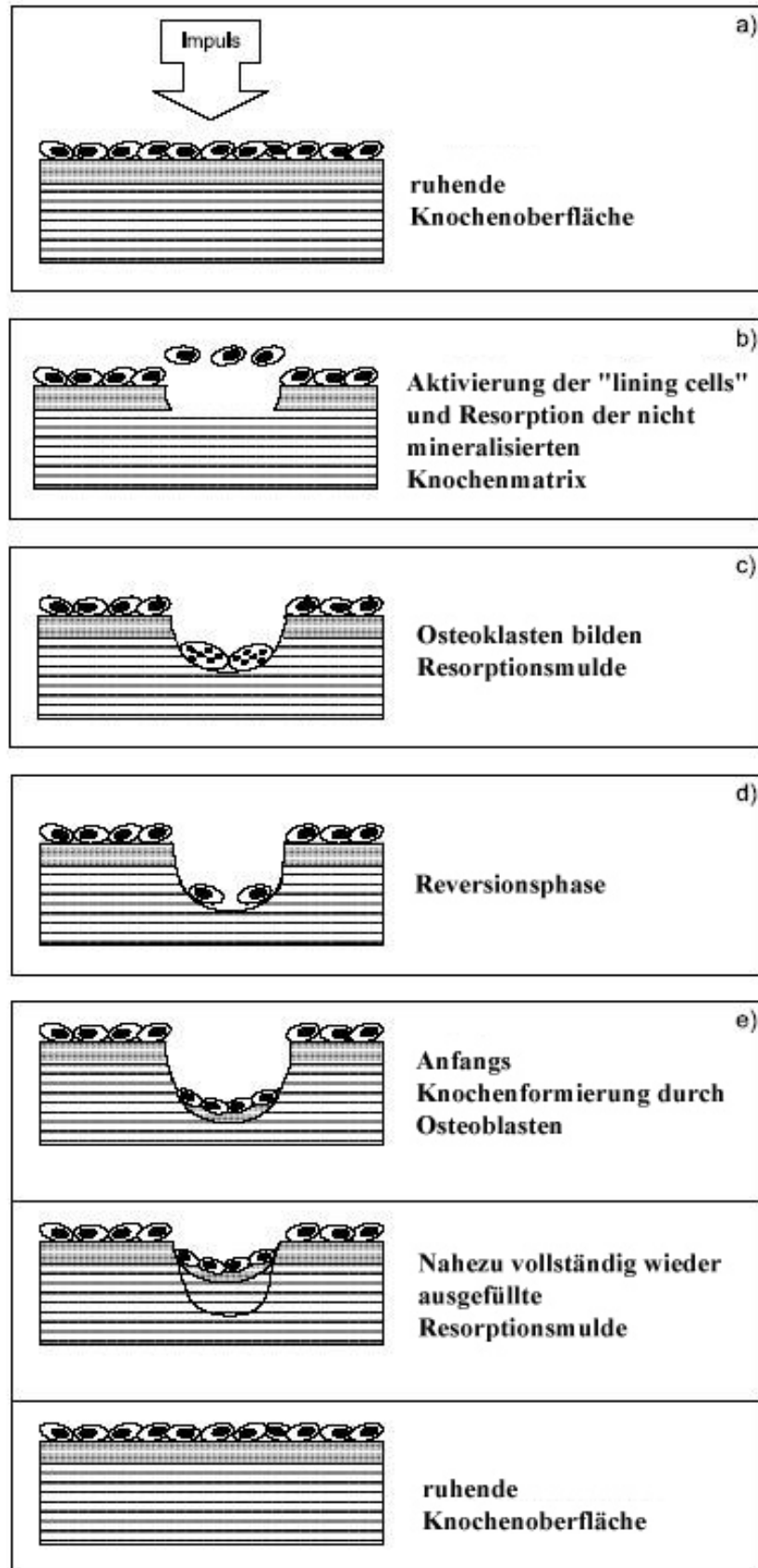


Abb.2: Bone-Remodeling (aus: Bubeck, 1994, S. 4)

2.1.4 Knochenbildung, Knochenwachstum und Knochenformen

Die Ossifikation, die Knochenbildung, wird unterschieden in desmale, auch direkte Ossifikation genannt, und in chondrale, auch indirekte Ossifikation genannt.

Weiter kann man die chondrale Ossifikation noch in perichondrale und enchondrale Ossifikation unterteilen.

Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation ist die häufigste Art der Knochenbildung. Mesenchymzellen vermehren sich in umschriebenen Gebieten und differenzieren zu Osteoblasten (Abb. 3). Diese synthetisieren Kollagenfasern und Osteoid, die Knochengrundsubstanz, die später durch Einlagerung von Hydroxylapatit verkalkt. Die eingelagerten Kollagenfasern haben bei dieser Knochenform einen ungerichteten, zufälligen Verlauf. In der Peripherie wird von den Osteoblasten immer wieder neues Knochengewebe gebildet und angelagert (=apositionelles Wachstum). Es entsteht Bindegewebs- oder Faserknochen, die einfachste Form von Knochengewebe. Bei länger anhaltender mechanischer Belastung wandelt sich der Faserknochen in Lamellenknochen um. Die desmale Ossifikation findet man vor allem an den platten Knochen des Schädeldaches, an den meisten Gesichtsknochen und an den Schlüsselbeinen.

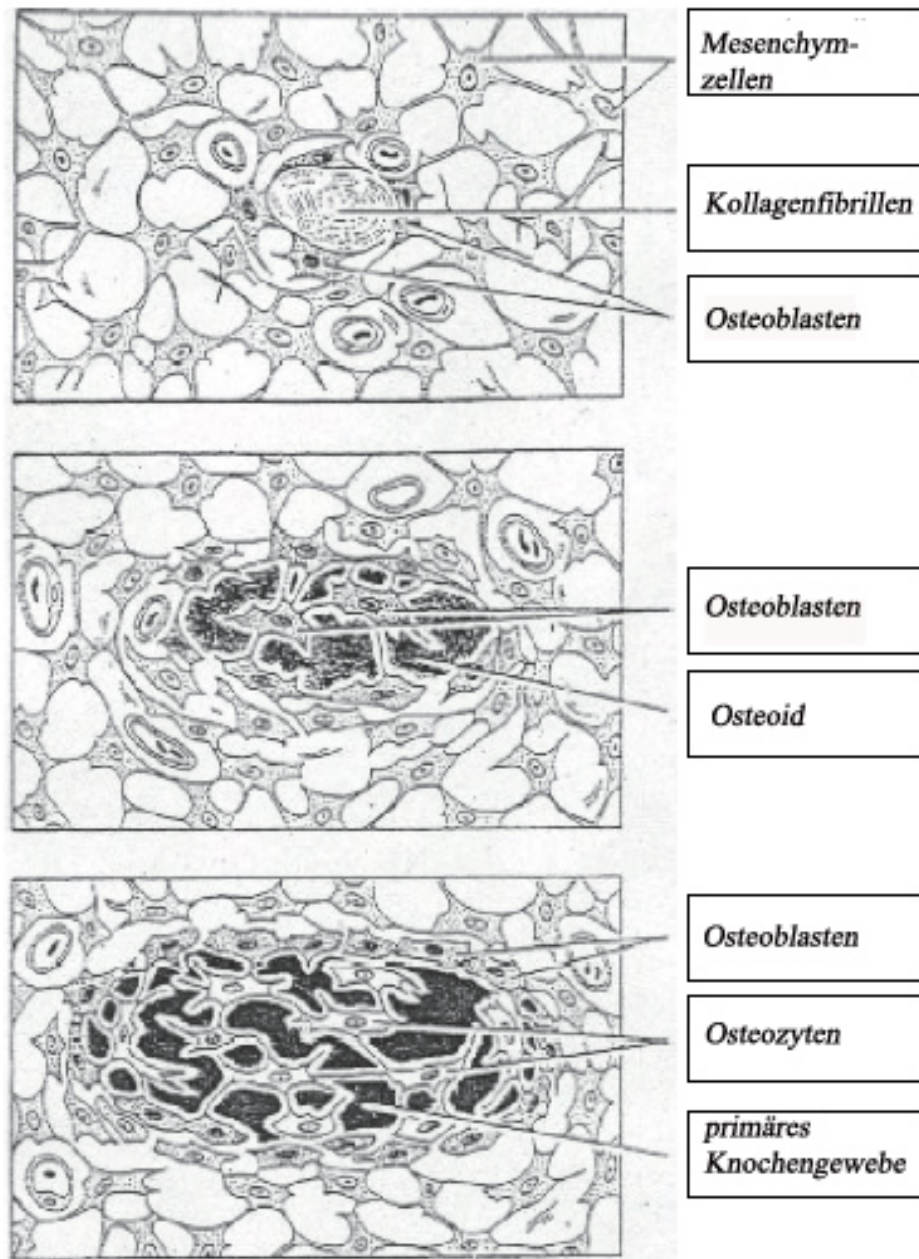


Abb. 3: Desmale Ossifikation (aus: Junqueira, 1996, S. 203)

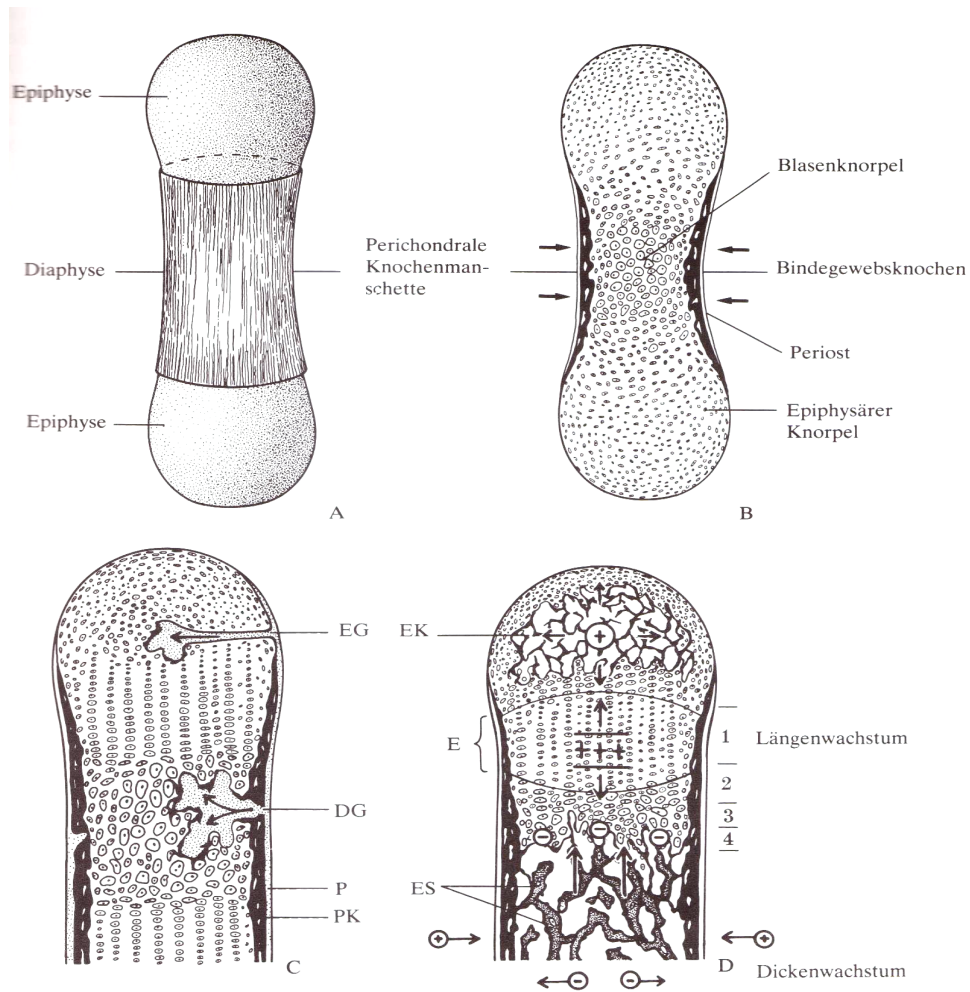
Chondrale Ossifikation

Die chondrale Ossifikation geht von hyalinem Knorpel aus (Abb. 4 und 5). Nach dem Ort der Knochenbildung unterscheidet man *perichondraler* von *enchondraler* Ossifikation, die zeitlich etwas gegeneinander versetzt verlaufen .

Bei perichondraler Ossifikation handelt es sich um desmale Knochenbildung an der Knochenoberfläche. Bei enchondraler Ossifikation wird hyaliner Knorpel abgebaut und durch Geflechtknochen ersetzt. Ab der 5. - 6. Embryonalwoche wird fast das ganze hyaline Primordialskelett, bis auf Gelenkknorpel, Rippenknorpel u.a., über chondrale Ossifikation durch Knochen ersetzt.

Die *perichondrale Ossifikation* geht vom Perichondrium der Schaftmitte (Diaphyse) langer Röhrenknochen aus. Vom Perichondrium aus entstehen desmale Ossifikationszentren, und es bildet sich eine, die Diaphyse zirkulär umgreifende, Knochenmanschette. Das Perichondrium selbst wird zum Periost. Das appositionelle Wachstum des perichondralen Knochens in Richtung der beiden Epiphysen schient den Knochen, so dass Resorptionsvorgänge der enchondralen Ossifikation nicht zu einem Verlust an Stabilität führen (Abb. 4).

Die *enchondrale Ossifikation* beginnt mit Hypertrophie (Blasenknorpel) und Abbau von Chondrozyten im Bereich der Epiphysenplatten. Die Ernährung der Knorpelmatrix wird durch die perichondrale Knochenmanschette beeinträchtigt, die Chondrozyten hypertrophieren und die Knorpelgrundsubstanz verkalkt und degeneriert. Es bilden sich Lakunen, in die Blutgefäße und Mesenchymzellen aus dem Periost einwachsen und sich dort zu Osteoblasten differenzieren. Weitere Ab- und Umbauvorgänge folgen und es entsteht die primäre Markhöhle. Im Bereich zwischen Epiphysenplatte und primärer Markhöhle lassen sich verschiedene Schritte der enchondralen Ossifikation erkennen (Abb. 5)



A= Bildung der perichondralen Knochenmanschette

B= Entwicklung des Blasenknorpels im Bereich der Diaphyse

C= Beginn der enchondralen Ossifikation mit Einsprossung eines diaphysären (DG) und später auch epiphysären (EG) gefäßreichen Mesenchymsprosses in das Knorpelgewebe; P=Periost; PK= periostale Knochenmanschette

D= Bildung der Epiphysenfuge (E), des epiphysären Knochenkerns (EK) und der chondralen Knochenspongiosa (ES); 1 – 4 =Zonengliederung: 1=Vermehrungszone; 2=Blasenknorpelzone; 3=Zone des Knorpelabbaus; 4=Ossifikationszone

Abb. 4: Perichondrale und enchondrale Knochenbildung (aus: Rohen/Lütjen-Drecoll: Funktionelle Histologie)

1. Reservezone

- Zone des ruhenden Knorpels

2. Proliferationszone

- Zone des Säulenknorpels

3. Resorptionszone

- Zone des Blasenknorpels
- Hypertrophie der Chondrozyten
- Kalzifizierung des Knorpels

4. Verknöcherungszone

- Eröffnungszone
- Knorpelzellen gehen zugrunde
- Abbau des Knorpels durch Chondroklasten
- Vaskularisierung der ehemaligen Chondrozytenhöhlen
- Differenzierung von Osteoblasten
- Bildung von Bindegewebsknochen

5. Primäre Knochenbälkchen und Knochenmark

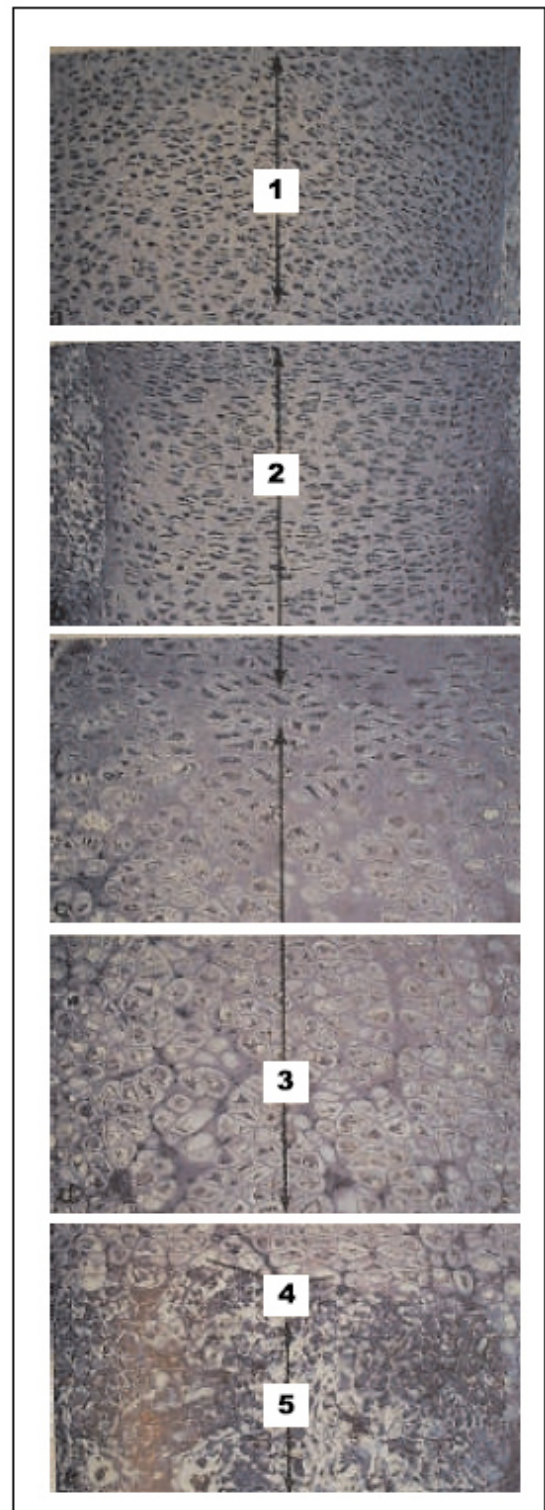


Abb. 5: Zonen der chondralen Ossifikation (aus: Bucher, Wartenberg, 1997, S. 135)

2.1.5 Knochenheilung

Knochengewebe ist als einziges Gewebe in der Lage, im Falle eines Gewebedefekts, z.B. einer Fraktur, minderwertiges, verletztes Gewebe durch neu synthetisierte Knochensubstanz zu ersetzen. Diese Fähigkeit verleiht dem Knochen nach Wochen der Heilung wieder seine hohe Stabilität. Die Knochenneubildung kann vom Endost, Periost und vom Havers-System ausgehen. Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer Knochenheilung:

Primäre Knochenheilung

Damit es zur primären Knochenheilung kommen kann, dürfen die beiden Frakturrenden nicht weiter als 1 mm auseinander liegen. Ebenso wie bei der normalen Ossifikation resorbieren Osteoklasten das minderwertige Knochengewebe. Die dadurch entstandenen Defekte werden dann von Osteoblasten mit neuer Knochenmatrix aufgefüllt. Es erfolgt keine Kallusbildung. Man spricht auch von Kontaktheilung.

Sekundäre Knochenheilung

Bei mehr als 1mm Abstand zwischen den beiden Frakturrenden, kommt es zur Knochenheilung in mehreren Schritten (Abb. 6):

1. Entzündung

Im Bereich des Frakturspalts kommt es zu Hämatomen, Gefäßeinrissen und aufgrund mangelnder Blutversorgung zu Knochennekrosen. Entzündungszellen, mesenchymale Zellen und Prä-Osteoblasten wandern entlang neu einsproßender Gefäße ein.

2. Bindegewebiger Kallus

Durch Proliferation von Bindegewebszellen entsteht ein kapillarreiches, fibröses Granulationsgewebe, das beide Frakturrenden miteinander verbindet und in ihrer Beweglichkeit einschränkt. Diesen Bindegewebspfropf nennt man Kallus.

3. Knöcherner Kallus

Fibroblasten und Prä-Osteoblasten wandeln sich in Osteoblasten um und bilden Osteoid. Dieses verknöchert zunehmend durch Mineralisation, und es entsteht ein aus Faserknochen gebildeter knöcherner Kallus.

4. Remodeling

Durch länger bestehende mechanische Reizung wandelt sich der Faserknochen dann in den endgültigen Lamellenknochen um. Die normale Knochenstruktur wird von Osteoklasten und Osteoblasten wiederhergestellt.

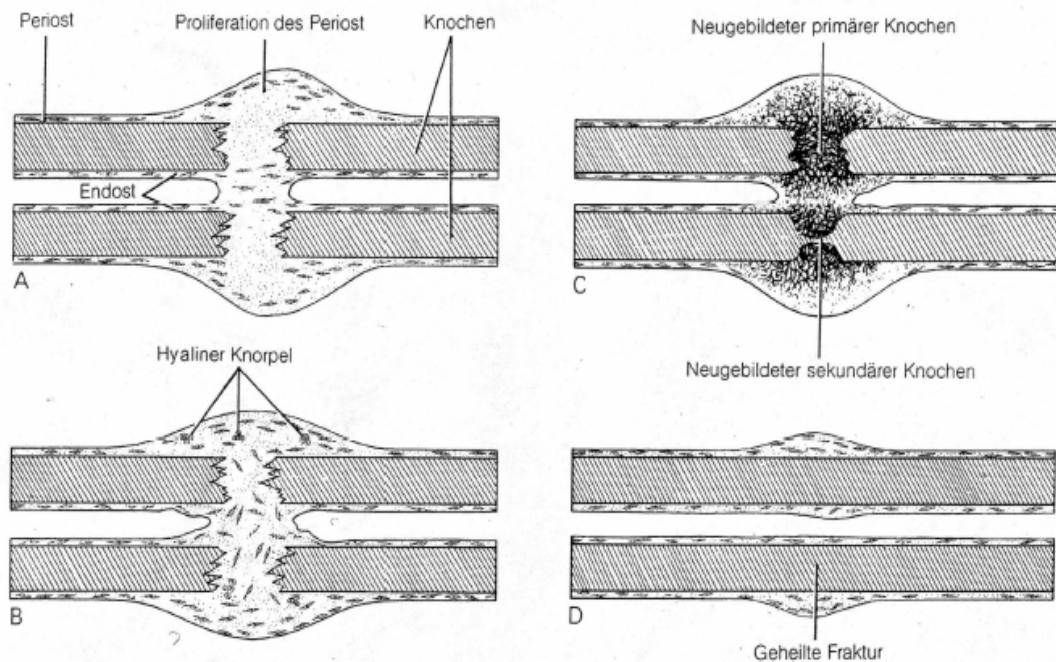


Abb. 6: Sekundäre Knochenheilung (aus: Junqueira, 1997, S. 211)

Es wird angenommen, dass der Prozess der Osseointegration im Prinzip der sekundären Frakturheilung entspricht (2).

2.2 Parathormon (PTH)

2.2.1 Struktur und Biosynthese

Das Parathormon (PTH) wird in den Nebenschilddrüsen, auch Epithelkörperchen genannt, gebildet und ist zusammen mit Calcitonin und Calcitriol wesentlich an der Kalzium- und Phosphat-Homöostase beteiligt. PTH ist ein aus einer Sequenz von 84 Aminosäuren (AS) bestehendes Polypeptid, dessen Synthese über mehrere Vorstufen verläuft. Von dem zu Beginn bestehenden Prae-Pro-Parathormon aus 115 Aminosäuren, wird im rauhen endoplasmatischen Retikulum eine 25 Aminosäure-lange Signalsequenz abgespalten, und es entsteht als Zwischenprodukt Pro-Parathormon mit einer Sequenz von 90 Aminosäuren (Abb. 7). Darauf folgend wird im Golgi-Apparat durch proteolytische Enzyme ein N-terminales Hexapeptid abgespalten und reifes aktives PTH gebildet. Untersuchungen haben ergeben, dass die Zellen der Nebenschilddrüsen nur wenig PTH in gespeicherter Form besitzen. Deswegen geht man davon aus, dass PTH kontinuierlich synthetisiert und sezerniert wird (21). Die gesamte Biosynthese benötigt weniger als 1 Stunde.

Zur Exozytose bei Hypokalzämie kommt es schon innerhalb von Sekunden (22). Kalzium reguliert nicht nur die Ausschüttung, sondern auch die Syntheserate von PTH. Bei Hypokalzämie ist die Parathormonsynthese gesteigert, bei Hyperkalzämie dagegen gedrosselt. Gemessen wird der Serumkalziumspiegel über ein spezielles, membranständiges Kalzium-Rezeptor-Protein, das ein langes N-terminales Ende, sieben Transmembrandomänen und ein kurzes C-terminales Ende besitzt. Es gehört zur Gruppe der G-Proteine. Bei Aktivierung dieser Rezeptor-Proteine durch eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration kommt es über eine Steigerung der Adenylatzyklaseaktivität zu einer Zunahme von intrazellulärem cAMP und Inositolphosphat und darüber zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration; dies hemmt die PTH-Synthese und Kalziumfreisetzung. Der Abbau von PTH erfolgt in den Epithelkörperchen sowie in Leber und Niere. Durch die erste Spaltung im hinteren Drittel des PTH entstehen ein noch voll aktives (AS 1-33) N-terminales und ein inaktives (AS 34-84) C-terminales Bruchstück (23). Diese Bruchstücke werden dann an das Blut weitergegeben und zirkulieren, bevor sie über die Niere eliminiert werden,

aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit bis zu 100-mal länger im Blut als das intakte PTH (24). Deshalb ist das Bestimmen der reinen Serum-PTH-Konzentration erschwert durchführbar.

Bei Hypokalzämie sinkt die Abbaurrate von PTH, und es wird hauptsächlich aktives PTH (1-84) sezerniert; bei Hyperkalzämie dagegen nimmt der Abbau von PTH zu und überwiegend inaktive C-terminale Bruchstücke werden sezerniert (24). Die Aminosäuresequenz verschiedener Spezies, z.B. von Rind, Schwein und Ratte, ist der des Menschen sehr ähnlich (23).

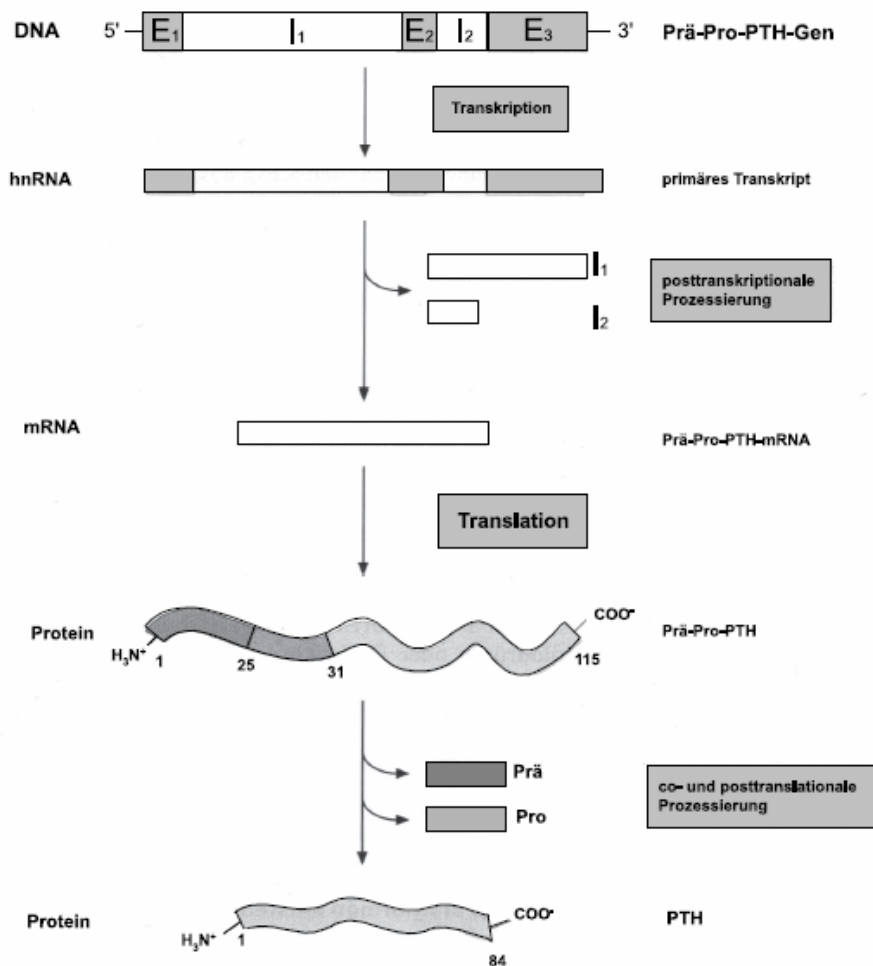


Abb. 7: Das Prä-Pro-PTH-Gen und die Prozessierung seines Transkriptions- und Translationsproduktes
(aus: Löffler, Petrides, 1998, S. 860)

2.2.2 Wirkung und Funktion von Parathormon

Parathormon reguliert zusammen mit Calcitonin und Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) die Homöostase des Kalziumspiegels im Serum und hält diesen konstant zwischen 2,1 und 2,6 mmol/l. Von dem Kalzium liegt etwa die Hälfte in ionisierter und damit wirksamer Form vor. Der Rest ist vorwiegend an Proteine gebunden. PTH bindet an spezielle PTH-Rezeptoren, die sich unter anderem auf Zellen des Skelettsystems, der Niere und auf Zellen des Gastrointestinaltraktes befinden (Tab. 2). Die genaue Wirkung und Funktion von Parathormon auf die meisten dieser Gewebe ist bisher noch nicht geklärt. Wird PTH parenteral gegeben, kommt es zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration und Abfall des anorganischen Phosphates. Dies lässt sich durch die Wirkung des PTH auf die oben genannten Zellen erklären.

- Wirkung auf die Niere

Bei Bindung von PTH kommt es über Hemmung der Rückresorption von Phosphat am proximalen Tubulus und gleichzeitiger Steigerung der aktiven Sekretion von Phosphat am distalen Tubulus zur Phosphaturie. Die Kalziumrückresorption im distalen Tubulus dagegen wird verstärkt und kann von 90% auf bis zu 98% gesteigert werden (24). Zusätzlich stimuliert PTH die Hydroxilierung von 25-Hydroxycholecalciferol zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxycholecalciferol im proximalen Tubulus, das zur Resorption von Kalzium im Gastrointestinaltrakt erforderlich ist. Außerdem senkt PTH noch die Aktivität einer 24-Hydroxylase, die 1,25-Dihydroxycholecalciferol inaktiviert.

- Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt

Parathormon stimuliert an der Dünndarmmukosa die Resorption von Kalzium und Magnesium. Diese Wirkung ist allerdings Vitamin D-abhängig und von eher geringerer Bedeutung in der Regulation der Kalziumhomöostase.

- Wirkung auf das Skelettsystem

Parathormon besitzt, abhängig von Dosis und Dosisintervall, eine katabole und eine anabole Wirkungsweise.

Die katabole Wirkung von PTH erfolgt über Aktivierung von Osteoblasten und dadurch indirekte Aktivierung von Osteoklasten. Es resultiert die Resorption von

Knochen und Freisetzung von im Knochen gespeichertem Kalzium. Die indirekte Aktivierung der Osteoklasten erfolgt über das RANKL/RANK-System, wie in Kapitel 2.1.2 bereits beschrieben. Ferner werden von den Osteoblasten Kollagenasen sezerniert, die die Knochenoberfläche aufrauen und den Osteoklasten eine verbesserte Ansatzfläche schaffen.

Durch die von den Osteoklasten sezernierten Kollagenasen und Hydrolasen kommt es zur vermehrten Freisetzung von Hydroxyprolin (25). Dieser erhöhte Parameter lässt sich im Urin messen und kann als diagnostischer Parameter für den Knochenabbau verwertet werden.

Die anabole Wirkung von Parathormon wurde erstmals 1932 von Selye nachgewiesen: Die einmalige, tägliche Gabe von Parathormon führte in Ratten zu einer erhöhten Knochendichte verglichen mit unbehandelten Ratten. Eine Steigerung der Dosis dagegen führt zur Knochenresorption (26). Es folgten weitere Versuche, die bewiesen, dass die intermittierende Gabe von Parathormon zur Erhöhung von Knochendichte und Knochenmasse führt, besonders im Bereich der Spongiosa (27-29), wohingegen die kontinuierliche Gabe zu einer Abnahme der Knochendichte und -masse führt.

1988 konnten Kim et al. nachweisen, dass Parathormon die mechanische Festigkeit und Kallusbildung von Frakturen in osteosklerotischem Knochen ovariectomierter Ratten erhöht. Weitere Versuche bewiesen dies auch für junge, stoffwechselgesunde Ratten (29-31).

Der genaue Mechanismus der anabolen Wirkung konnte bisher nicht endgültig geklärt werden, es gibt aber verschiedene Theorien. Fest steht:

- Parathormon erhöht die Anzahl und Aktivität von Osteoblasten (10).
- Parathormon induziert die Proliferation und Differenzierung von Progenitorzellen zu Osteoblasten und führt so nebst anderen Faktoren zu einem anabolen Effekt (32, 33)
- Unter PTH Parathormon-Einfluss werden Bone Lining Cells reaktiviert, die daraufhin zu Osteoblasten differenzieren. Der anabole Effekt ist demnach auch von der Anzahl bereits vorhandener Bone Lining Cells abhängig (10, 34).
- Intermittierender Parathormon-Einfluss verlängert die Lebenszeit von reifen Osteoblasten durch zeitliche Verzögerung ihres Eintritts in die Apoptose und führt folglich zu einem Anstieg ihrer Knochenmatrix-

synthetisierenden Zeitspanne, woraus eine Zunahme an Knochenmasse resultiert (35).

Interaktionen von PTH mit Wachstumsfaktoren scheinen ebenfalls für den anabolen bzw. katabolen Effekt ausschlaggebend zu sein. Die Synthese von z.B. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und Insulin-like Growth Factor-bindender Proteine 3, 4 und 5 (IGF-BP) wird unter intermittierender Parathormon - Einwirkung verstärkt (36). Eine intermittierende Parathormon -Exposition von 1 - 100nM führt zu einer 2- bis 4-fachen Erhöhung der IGF-1 Konzentration (36). Bei kontinuierlicher Gabe dagegen kommt es über eine Konzentrationssteigerung des IGF-BP 4, das als IGF-1-Inhibitor gilt, zu kataboler Wirkung (37).

Eine einmalige Gabe von 80 $\mu\text{mol/kg}$ KG PTH führt zur vermehrten Expression von Immediate Early Genes (IEG), wie z.B IL-6, c-jun, c-fos und c-myc. Diese IEG's führen zur Steigerung der Zelldifferenzierung bei gleichzeitiger Senkung der Zellproliferation (38-40). Die Interaktionen von Parathormon und Osteoklasten über das RANKL/RANK-System sind zusätzlich abhängig von der jeweiligen Art der Dosierung des Parathormons. Bei kontinuierlicher Gabe von Parathormon kommt es über eine Zunahme von RANKL-Rezeptoren zur Abnahme von Osteoprotegerin, einem hemmend wirkendem, RANKL-bindenden Rezeptor. Die Knochenresorption und der damit verbundene katabole Effekt nehmen zu. Bei intermittierender Gabe von PTH dagegen, kommt es zu entweder nur vorübergehenden Veränderungen von RANKL und Osteoprotegerin oder diese bleiben sogar aus (41). Von Ishizuya et al. wurde beschrieben, dass die Parathormonwirkung auf Osteoblasten in-vitro auch abhängig ist vom Reifezustand der Osteoblasten, vom Expositionszeitpunkt und von der Expositionsdauer gegenüber Parathormon. Die unterschiedliche Wirkung, abhängig von Expositionsdauer und -zeitpunkt, wird über Inhibition oder Induktion der Signaltransduktionswege cAMP/PKA und Ca^{2+} /PKC vermittelt (42). Die Wirkung des Parathormons ist also wesentlich von Dosismenge und Art der Dosierung, kontinuierlich oder intermittierend, abhängig.

Tab. 2: Vorkommen von Rezeptoren für Parathormon (aus: Löffler, Petrides, 1998, S. 862)

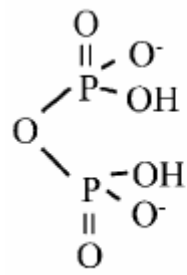
Gewebe	Menge
Knochen	++
Nieren	++++
Leber	++
Lunge	++
Testes	++
Brustdrüse	+
Ileum	+
Haut	+
Uterus	+
Skelettmuskel	+
Myokard	+
Ovar	+
Schilddrüse	-
Hypophyse	-
Prostata	-

2.3 Bisphosphonate

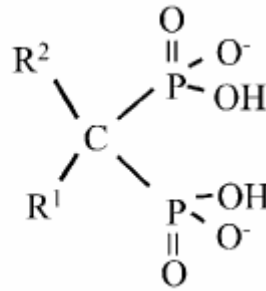
Bisphosphonate werden seit ca. 100 Jahren in der chemischen Industrie angewendet, beispielsweise als Korrosionsschutz oder als komplexe Verbindungen in der Textil- und Ölindustrie. Erst in den letzten 4 Jahrzehnten entdeckte man Bisphosphonate als Medikament zur Therapie von verschiedensten Störungen des Knochen-, Zahn- oder Kalziumhaushaltes. Sie werden, an ⁹⁹Technetium gebunden, auch in der Szintigraphie verwendet. Bisphosphonate entstanden als Weiterentwicklung von Pyrophosphaten, besitzen statt eines Sauerstoffatoms ein Kohlenstoffatom (Abb. 8) und haben den Vorteil, dass sie bei gleichbleibender physiochemischer Wirkung resistent gegenüber enzymatischer Hydrolyse sind. Dies ist besonders wichtig für die orale und parenterale Gabe von Bisphosphonaten.

2.3.1 Struktur und Pharmakokinetik von Bisphosphonaten

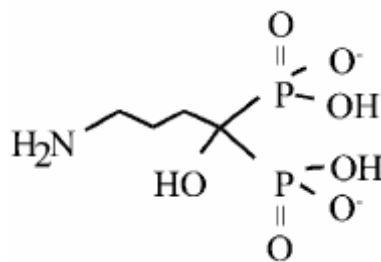
Alle Bisphosphonate besitzen eine P-C-P –Struktur (Abb. 8). Sie unterscheiden sich jedoch im Aufbau ihrer Seitenketten. Jedes Bisphosphonat besitzt, abhängig von der Struktur der Seitenketten, eigene chemische, physiochemische und biologische Eigenschaften. Neuere stickstoffhaltige Bisphosphonate, wie z.B. Pamidronat oder Alendronat, bewirken bei gleicher Dosis eine sehr viel stärkere Hemmung der Knochenresorption als ältere Bisphosphonate ohne Stickstoffgruppe in der Seitenkette. Allen Bisphosphonaten gemeinsam ist eine sehr schlechte Bioverfügbarkeit. Diese resultiert hauptsächlich aus der einerseits sehr geringen Lipophilie, die einen transzellulären Transport verhindert und andererseits aus ihrer negativen Ladung, die den parazellulären Transport behindert. Ihre Aufnahme erfolgt dennoch parazellulär und lässt daher auch die schlechte Resorptionsrate von <10% für z.B. Clodronat und bis zu <1% für neuere Bisphosphonate (43) erklären. Durch Einnahme der Bisphosphonate mit einer Mahlzeit verschlechtert sich die Resorptionsrate nochmals. Ein hoher intestinaler pH erhöht die Resorptionsrate, Einnahme mit Kaffee oder Orangensaft dagegen senkt diese. Ungefähr 80% der resorbierten Bisphosphonate werden von der Niere wieder eliminiert, die restlichen 20% werden vom Knochen aufgenommen. Im Plasma liegen Bisphosphonate größtenteils an Albumin gebunden vor. Nur der freie, nicht gebundene Anteil, bei Alendronat ca. 22%, bindet an Knochen. Dieser dann aber zu 80%. Ihre Halbwertszeit im Plasma beträgt ca. eine Stunde, während im Knochen eingebaute Bisphosphonate wahrscheinlich lebenslang persistieren und erst mittels Knochenresorption durch Osteoklasten wieder gelöst werden und eben diese dann hemmen. Daher kann die Einnahme von Bisphosphonaten auf wöchentliche oder monatliche bis hin zu jährlicher (Zolendronat) Einnahme beschränkt werden. Die Bedeutung von Bisphosphonaten in der Therapie der Osteoporose ist hauptsächlich zusammenhängend mit der Hemmung der Knochenresorption. Der knochenstabilisierende Effekt kommt durch Reduktion der Knochenresorption zustande, weniger durch Zunahme der Knochendichte. Besonders bei fortgeschrittener Osteoporose wird das Frakturrisiko gemindert, da weiterer Knochenabbau verhindert wird.



Pyrophosphat



Bisphosphonat



Alendronat

Abb. 8: Strukturformeln

2.3.2 Wirkung und Funktion von Bisphosphonaten

Bisphosphonate haben zwei wesentliche biologische Effekte:

Hemmung der Knochenresorption und, in hohen Dosen appliziert, Hemmung der Mineralisation.

Zu Knochensubstanzverlust kommt es immer, wenn ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenwiederaufbau, dem sogenannten Remodeling, besteht. Solch ein Ungleichgewicht besteht z.B. bei der postmenopausalen Osteoporose, bei der Oestrogenmangel über eine Zunahme der Osteoklastenzahl und möglicherweise auch deren Aktivität zu einem gesteigerten Knochenabbau führt. Auf ähnliche Weise kommt es auch bei Morbus

Paget, bei periodontalen Erkrankungen und bei osteolytischen Knochenmetastasen über einen Anstieg der Osteoklastenzahl und/oder -aktivität zu lokalem Knochensubstanzverlust. Das wesentliche Wirkprinzip, das die Medizin sich bei Bisphosphonaten für therapeutische Zwecke zu Nutzen macht, ist die Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten.

Die Wirksamkeit von Bisphosphonaten in Bezug auf die Reduktion der Knochenresorption konnte für Osteoporose (44), Morbus Paget (45), Behandlung der tumor-assoziierten Hyperkalzämie (46) und für osteolytische Knochenmetastasen (47) in früheren Studien belegt werden. In der Kieferchirurgie gibt es bereits Ansätze Bisphosphonate topisch an alveolärem Knochen einzusetzen, um die traumatisch bedingte Knochenresorption nach Operationen zu mindern (48). Es wird angenommen, dass, auf zellulärer Ebene, Osteoklasten das Hauptangriffsziel der Bisphosphonatwirkung sind. Bisphosphonate wirken auf die Osteoklasten entweder direkt oder indirekt über Zellen, die die Osteoklastenformation oder deren Aktivität regulieren können. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Bisphosphonate die Knochenresorption durch Osteoklasten über vier unterschiedliche Wege beeinflussen (49):

1. Hemmung der Aktivität reifer Osteoklasten

Bisphosphonate hemmen die Osteoklastenaktivität direkt durch das Auflösen der „ruffled“ oder „sealed membrane“ (50). Der genaue Mechanismus der Bisphosphonataufnahme in Osteoklasten und deren Wirkung dort konnte bisher nicht endgültig geklärt werden. Man nimmt an, dass sie durch Endozytose in die Zellen gelangen und dort Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselwege der Zelle haben (51).

2. Hemmung der Osteoklastengenese

In-vitro-Experimente haben ergeben, dass Alendronat bereits in sehr geringer Menge (10 – 30 μM) die Differenzierung von Knochenmarkstammzellen zu Osteoklasten hemmt (52). Experimente an Tieren konnten zeigen, dass sich zu Beginn einer Behandlung mit Bisphosphonaten die Osteoklastenzahl auf der Knochenoberfläche erhöht, unter Langzeitbehandlung dann allerdings reduziert wird (53).

3. *Hemmung der Osteoklastenaktivierung*

Es ist bewiesen, dass viele Faktoren, wie z.B. Prostaglandine, IL-1 oder TNF- α , die die Knochenresorption stimulieren, Osteoklasten indirekt über die Osteoblastenzelllinie beeinflussen (54). Experimente an Ratten zeigten, dass die Hemmung der Osteoklastenaktivierung durch Bisphosphonate (Alendronat) in Gegenwart von Osteoblasten bereits bei sehr geringer Dosierung stattfand, bei Abwesenheit der Osteoblasten dagegen waren sehr viel höhere Konzentrationen nötig (55).

4. *Verkürzung der Osteoklasten-Lebensdauer*

Hughes et al. (1995) konnten zeigen, dass Bisphosphonate über eine Bildung von ATP-Analoga die Apoptose bei Osteoklasten induzieren und so deren Lebenszeit verkürzen. Dies führt zu einer Abnahme der Gesamtzellzahl der Osteoklasten (56, 57).

Auf molekularer Ebene liegen den oben genannten Effekten auf die Osteoklasten zwei essentielle Mechanismen zugrunde, die abhängig sind von der Struktur der Seitenketten des jeweiligen Bisphosphonates. Es wird grundsätzlich unterschieden zwischen einfachen bzw. älteren und nitrogenhaltigen Bisphosphonaten. Zum einen wirken die nitrogenhaltigen Bisphosphonate, wie Alendronat oder Risendronat, auf den Cholesterinstoffwechsel der Osteoklasten über eine Hemmung des Mevalonatzyklus. Zum anderen werden die einfachen Bisphosphonate, wie Clodronat und Etidronat, in ATP-Analoga umgewandelt und so zu intrazellulären Metaboliten, die die Apoptose des Osteoklasten induzieren (57). Nitrogenhaltige Bisphosphonate, da sie als Analoga des Farnesylpyrophosphat wirken, hemmen als falsches Substrat die Farnesyldiphosphatsynthetase und so wichtige Schritte der Signaltransduktion im Osteoklasten (57). Statine scheinen ebenso über eine Hemmung des Mevalonatzyklus den Knochenaufbau verbessern zu können (58). Zusätzlich können Bisphosphonate die Tyrosin-Phosphatase hemmen und darüber Einfluss auf Osteoklastenformation und Resorptionsaktivität nehmen (59).

Bisphosphonate besitzen aber noch eine andere wichtige Wirkung. Sie binden an Kristalle des Kalziumphosphats, verhindern die Umwandlung von

Kalziumphosphat in Hydroxylapatit und so die Anhäufung von Hydroxyapatitkristallen (43).

Die Mineralisationshemmung trat im Gegensatz zur antiresorptiven Wirkung erst bei Applikation höherer Dosierungen auf, führte aber zu der Einsicht, dass Bisphosphonate sich nicht, wie früher erhofft, als Hemmer der ektopen Kalzifikation, wie z.B. Chondrokalzinose oder Arterienverkalkung, einsetzen liessen. Bei modernen Bisphosphonaten setzt die antiresorptive Wirkung bereits in sehr geringer Dosis von z.B. 2–10 mg/d ein, während die Mineralisationshemmung erst bei Dosen von 800–1000 mg/d einsetzt. In der Therapie von Osteoporose oder Morbus Paget können deshalb Bisphosphonate in niedriger Dosierung ohne Befürchtungen einer Osteomalazie eingesetzt werden. Abhängig von den jeweiligen Seitenketten besitzen die einzelnen Bisphosphonate unterschiedliche Nebenwirkungen. Im Gegensatz zu älteren Bisphosphonaten wie Clodronat, denen eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, scheinen Bisphosphonate wie Alendronat und Pamidronat, die eine N-terminale Seitenkette besitzen, pro-inflammatorisch zu wirken; so kann als Nebenwirkung bei intravenöser Injektion von Pamidromat oder Alendronat kurzzeitig grippeartiges Fieber auftreten (60). Bei oraler Applikation von Bisphosphonaten können, besonders in hoher Dosierung, gastrointestinale Symptome auftreten.

2.4. Implantate und Osseointegration

Das Hauptproblem im Einsatz von orthopädischen Knochenimplantaten in der heutigen Medizin liegt in der Implantatlockerung, obgleich die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensdauer eines Implantats heutzutage bei etwa 97 % liegt (61). Während früher zusätzlich Infektionen und Implantatinsuffizienz den Einsatz von Implantaten erschwerten, steht heute das Problem der aseptischen Implantat-Lockerung im Vordergrund. Es gibt verschiedene Theorien zur Ursache der aseptischen Implantatlockerung:

- Durch Abnutzungspartikel der künstlichen Gelenkflächen kommt es über Entzündungsreaktionen zu einer Osteoklastenaktivierung und daher zu Knochenabbau (62, 63).
- Ein erhöhter Flüssigkeitsdruck in der Gelenkhöhle wirkt sich negativ auf die Implantat-Knochen-Kontaktfläche aus und führt zu Osteolysen (64-66).
- Durch minimale Bewegungsfreiheit des Implantates kann es an der Implantat-Knochen-Kontaktfläche direkt oder indirekt aufgrund kleiner Knochenpartikel zu Osteolysen kommen (67).

Die aseptische Implantatlockerung scheint multifaktoriell bedingt zu sein, allen Theorien gemein ist aber: Es kommt als Folge - über Osteoklastenaktivierung - zu einer Reduktion des Implantat-Knochen-Kontakts. Knochengewebe wird abgebaut und durch Bindegewebe ersetzt. Substanzen, wie Parathormon und Bisphosphonate, die die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten regulieren, können also positiv auf Knochenheilung und hemmend auf Implantat-Lockerung einwirken. Es gibt Methoden, die den Implantat-Knochen-Kontakt verbessern und die Bindegewebsschicht zwischen Knochen und Implantat, die Osseointegration, reduzieren können. Der Begriff Osseointegration wurde 1970 von Brånemark eingeführt und bezeichnete eine chemische Verbindung zwischen Knochen und Implantat. Heutzutage versteht man unter Osseointegration das Nichtvorhandensein einer lichtmikroskopisch nachweisbaren fibrösen Bindegewebsschicht zwischen Knochen und Implantat (67). So konnten Kitsugi et al. beispielsweise zeigen, dass sich die Osseointegration von Titaniumimplantaten verbessert, wenn diese zuvor 4 Stdn. mit NaOH behandelt und anschließend eine

Stunde bei 600°C erhitzt werden. Dabei bildet sich auf der Implantatoberfläche ein Titanium-Gel-Film, der vermehrt OH⁻-Gruppen besitzt und dadurch eine gesteigerte Bildung von Hydroxylapatit induziert (68, 69).

Die Implantatlockerung hingegen scheint mit verschiedenen Einflussgrößen in Zusammenhang zu stehen (70-72):

- Operateur
- demographischen und physiologischen Variablen (Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Aktivität, Indikationsdiagnose, Hüftdysplasie, Weite des Femoralkanals, frühere Hüftoperationen Operationstechnik) (1, 73)
- Prothesendesign (Größe, Länge der femoralen Komponente, Art des Zements etc.)
- Positionierung (Varus/Valgus-Stellung) (1)
- Primärstabilität

Da während der Implantation gleichzeitig verschiedene Faktoren, die von Prothese, vom Patienten und vom Operateur abhängen, auf das Implantat einwirken, scheint besonders dieser Zeitraum entscheidend für die spätere Implantatintegration zu sein (1).

2.4.1 Implantatverankerung

Die Funktionalität und Haltbarkeit von implantierten Endoprothesen hängt entscheidend ab von der primären Fixierung im Skelettsystem. Bisläng versuchte man überwiegend die Primärstabilität durch Veränderungen von Material und Design zu verbessern. Hierbei wurden biomechanische Einflussgrößen, wie z.B die Prothesensteifigkeit ($E \cdot I_x$), und werkstoffbedingte Einflussgrößen, z.B die Biokompatibilität, berücksichtigt.

Zusätzlich lässt sich die Implantatintegration auch durch eine verbesserte Knochenheilung herbeiführen. Es gibt 3 verschiedene Möglichkeiten diese zu verbessern:

1. Osteokonduktion

Osteokonduktive Materialien unterstützen die Knochenformation indirekt; fibrovaskuläres Gewebe haftet sich an poröse Strukturen oder Oberflächen und wird in Knochengewebe umgewandelt (74, 75).

Zu diesen Materialien gehören:

- Knochentransplantate
- Ca^{2+} /Phosphatbeschichtung
- Kollagene
- Polymere, Bioglas, einige Metalle

2. Osteogenese

Unter Osteogenese versteht man die direkte Stimulation lokaler Knochenformationen, indem man Zellen in Form von autologem Knochenmark oder autologen Knochentransplantaten zuführt. Außerdem sollen osteogenetische Effekte auch durch Implantatbeschichtung mit Ca^{2+} -Phosphat zu erzielen sein (76).

3. Osteoinduktion

Hierunter versteht man die Stimulation von Mitosen in perivaskulär gelegenen Zellen, woraufhin diese zu Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten oder Chondrozyten differenzieren. So ist eine extraskelettale Knochenformation ohne Anwesenheit von osteogenen oder osteokonduktiven Substanzen möglich. Eine Osteoinduktion wird unter anderem durch sogenannte BMP's, Bone Morphogenetic Proteins, induziert (z.B.: BMP-2, BMP-7, TGF- β). Sie alle gehören zur Familie der Transforming Growth Factors (77-79).

Auch mögliche spätere Implantatlockerung liesse sich also mit Hilfe oben genannter Mechanismen beeinflussen.

3. Material und Methoden

3.1 Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht

Als Versuchstiere wurden 40 männliche Ratten der Rasse Wistar ausgewählt und in 5 Gruppen zu á 8 Tieren unterteilt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere bereits erwachsen und wogen zwischen 306 g und 396 g. Die Elterntiere stammten von Charles River Deutschland, Sulfeld.

3.2 Tierversuchsgenehmigung

Der Tierversuch wurde von der Fachabteilung Lebensmittel und Veterinärwesen des Amtes für Gesundheit und Verbraucherschutz mit dem Schreiben vom 28.11.2002 unter dem Aktenzeichen 50/02 genehmigt.

Die Ausnahmegenehmigung für operative Eingriffe an Wirbeltieren wurde nach § 9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG erteilt.

3.3 Tierhaltung und Ernährung

Die Ratten wurden jeweils zu zweit in einem Makrolonkäfig Typ IV (Bodenfläche 1800 cm²) gehalten, mit freiem Zugang zu Wasser und einem Standard-Rattenfutter, das einen Calciumgehalt von 1,1% besitzt. Die Tiere hatten einen Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Die Raumtemperatur betrug ca. 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 – 60 %.

Zur Infektionsprophylaxe wurde dem Trinkwasser von Mitarbeitern der Tierhaltung Ost Enrofloxacin (Baytril®) in 10% Lösung (2ml/ 1 H₂O) zugegeben.

3.4 Versuchsaufbau

Unter Narkose wurde den 40 Tieren je eine Stahlschraube in die linke Tibia und je ein PMMA-Zementstab in die rechte Tibia implantiert.

Die Tiere wurden dann in 5 Gruppen á 8 Tiere unterteilt (Tab. 3):

Eine Kontrollgruppe, der perioperativ, also noch während der Narkose, ein NaCl-Serum-Gemisch (1,2 ml/kg KG) gewichtsadaptiert subkutan gespritzt wurde, zwei

Gruppen, denen jeweils perioperativ gewichtsadaptiert PTH bzw. Bisphosphonat subkutan gespritzt wurde und zwei Gruppen, denen 48 h postoperativ PTH bzw. Bisphosphonat (Alendronat, Fosamax®) gewichtsadaptiert (PTH 60 µg/kg KG) (Alendronat 200 µg/kg KG) subkutan gespritzt wurde. In der Kontrollgruppe verstarb ein Tier während der Narkose, so dass hier die Gruppenstärke nur 7 Tiere betrug. Das Gewicht der Tiere wurde jeweils direkt vor dem Spritzen bestimmt. Die subkutane Injektion erfolgte bei allen Tieren in die Nackenfalte.

Tabelle 3: Behandlungsschema der Versuchsgruppen

	Anzahl der Tiere	Injektionslösung
Kontrollgruppe	7	NaCl-Serum-Gemisch (1,2 ml/kg KG)
PTH perioperativ	8	PTH (60 µg/kg KG)
Bisph. perioperativ	8	Bisphosphonat (200 µg/kg KG)
PTH 48h postop.	8	PTH (60 µg/kg KG)
Bisph. 48h postop.	8	Bisphosphonat (200 µg/kg KG)

3.5 Geräte

- Schermaschine
- Ohrlocher
- 2 mm Handbohrer
- 1,5 mm Handbohrer
- Lichtmikroskop Neo-Phot 32, Carl Zeiss, Jena

- Lichtmikroskop Olympus BX 51 mit integrierter Digitalkamera
- Mikrotom
- Zentrifuge , Hettich Universal, Tuttlingen
- GFL Wasserbad Typ 1002
- Makrolonkäfig Typ IV (1800cm² Bodenfläche)
- Modulares Prüfsystem ZWICK® Z 2.5

3.6 Chemikalien und Verbrauchsmittel

- Rattenserum (inaktiviert), eigene Herstellung
- PTH(1-34)human, Bachem Heidelberg
- Bisphosphonat (Alendronsäure, Fosamax®) , MSD Sharp and Dome GmbH
- NaCl 0,9% , Braun Melsungen AG
- Ketamin, Pharmacia & Upjohn
- Carprofen (Rimadyl®), Pfizer GmbH, Karlsruhe
- Enrofloxacin (Baytril® 2,5%), Bayer
- Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%), Bayer
- Formaldehyd 4% in wässriger Lösung , Büsing & Fasch GmbH & Co
- Proline Pipetten, 50-200 µl / 0,5-10µl
- Spritzen, Kanülen, Skalpell, Biohit
- Eppendorf-Gefäße, Biohit
- Nahtmaterial (Vicryl® 4-0), Ethicon
- Biopsie-Behälter, Serologische Behälter (25 ml, steril), Falcon
- PMMA-Zementimplantate, Coripharm GmbH & Co KG Biomet Merck
- Stahlschrauben, Stainless steel (SS 2333), (Ø 1,7mm, Länge 3mm), Lund, Schweden
- Augensalbe (Bepanthen®), Roche Consumer Health

3.7 Herstellung der Injektionslösungen

Rattenserum (inaktiviert):

Den Tieren wurde mit Hilfe eines Serumröhrchens Blut abgenommen und dieses anschließend zentrifugiert. Danach wurde das Serum durch einstündige Inkubation in einem 56°C heissen Wasserbad inaktiviert.

Kontrollgruppen-Lösung: (2% Serum)

98,0 ml NaCl 0,9 %
+ 2,0 ml Rattenserum, inaktiviert

PTH(1-34)human-Lösung:

40,83 ml NaCl 0,9%
+ 0,83 ml Rattenserum, inaktiviert
+ 5 mg PTH(1-34)human (entspricht 120µg PTH/ml)

Bisphosphonat (Alendronat®) -Lösung:

122,5 ml Bisphosphonat (mit NaCl 0,9% verdünnt entspricht 160 µg Alendronat/ml)
+ 2,5 ml Rattenserum, inaktiviert

3.8 Herstellung der Implantate

-Stahlschrauben aus Stainless Steel (SS 2333):

Die Schraubenwindungen besitzen eine Länge von 3 mm und einen Durchmesser von $\varnothing = 1,7$ mm. Der Kopfteil der Schrauben ist dreieckig geformt, um in das Bohrfutter des Handbohrers zu passen. Zusätzlich befindet sich im Kopfteil eine Öffnung zur Befestigung eines Hakens bzw. Öse für die biomechanischen Messungen. Hergestellt wurden die Schrauben im Auftrag von Dr. R. Skripitz und Prof. Dr. P. Aspenberg von der technischen Abteilung des Universitätsklinikums Lund, Schweden (Abb. 9).



Abb. 9: Stahlschrauben-Implantat

-PMMA(Polymethylmethacrylat)-Zement-Stäbe:

Die PMMA-Implantate werden angefertigt, indem Palacos® , ein Knochenzement, bei einer Raumtemperatur von 23°C angemischt und in eine stabförmige Teflonform von 2x5mm gebracht wird. Nach 12-15 Min. sind die Stäbe ausgehärtet und können der Form entnommen werden. Die Stäbe besitzen eine zylindrische Form von 2x5 mm. Anschließend werden die Stäbe verpackt und mittels Ethylenoxid sterilisiert.

Die Roughness (Oberflächenrauigkeit) der PMMA-Stäbe beträgt 2,06 $\mu\text{m R}_a$.

3.9 Implantation der Stahlschrauben und PMMA-Zementstäbe

-Narkose und OP-Vorbereitungen:

Zu Beginn wurden die Tiere mittels CO₂/O₂Inhalation in einem Glasbehälter sediert und dann durch intraperitoneale Gabe eines Ketamin (12 mg/ml) –Xylazin (1,6 mg/ml) –Gemisches narkotisiert. Die Dosierung erfolgte gewichtadaptiert mit 5 mg/kg KG. Analgisiert wurde mit Carprofen (Rimadyl®) subkutan in einer Dosis von 4 mg/kg KG. Zur Infektionsprophylaxe wurde zusätzlich Enrofloxacin 2,5% (Baytril®) in einer Dosis von 5 mg/kg KG subkutan gespritzt. Um postoperative Augenentzündungen zu vermeiden, wurde den Tieren lokal Augensalbe (Bepanthen®) verabreicht. Dann wurden den Tieren beide Hinterläufe komplett geschoren und das ganze Tier, mit den hinteren Läufen voran, in einen sterilen Handschuh gesteckt. Der Handschuh wurde daraufhin auf Höhe der Kniegelenke eingeschnitten und die hinteren Extremitäten herausgezogen.

Die Hinterpfoten wurden mit sterilem Klebeband bedeckt und die hinteren Extremitäten mit einem jodhaltigen Antiseptikum (Beta-Isodona-braun) desinfiziert.

-Einsetzen der Implantate:

Der Unterschenkel wurde mit einem longitudinalen Hautschnitt an der medialen Tibiaseite eröffnet, das Periost mit Hilfe eines Skalpell abgeschabt und ein Loch mit einer Spritzen- Kanüle vorgebohrt. Diese Bohrlöcher wurden dann durch einen 1,5 mm-Handbohrer links und einen 2 mm-Handbohrer rechts geweitet. In die linke Tibia wurde jeweils eine Stahlschraube mittels eines Bohrfutters gedreht, bis der Kopfteil der Schraube das Periost berührte (Abb. 10). Der rechten Tibia wurde jeweils ein PMMA-Zementstab implantiert (Abb.11). Die Schnitte wurden durch eine Hautnaht verschlossen.

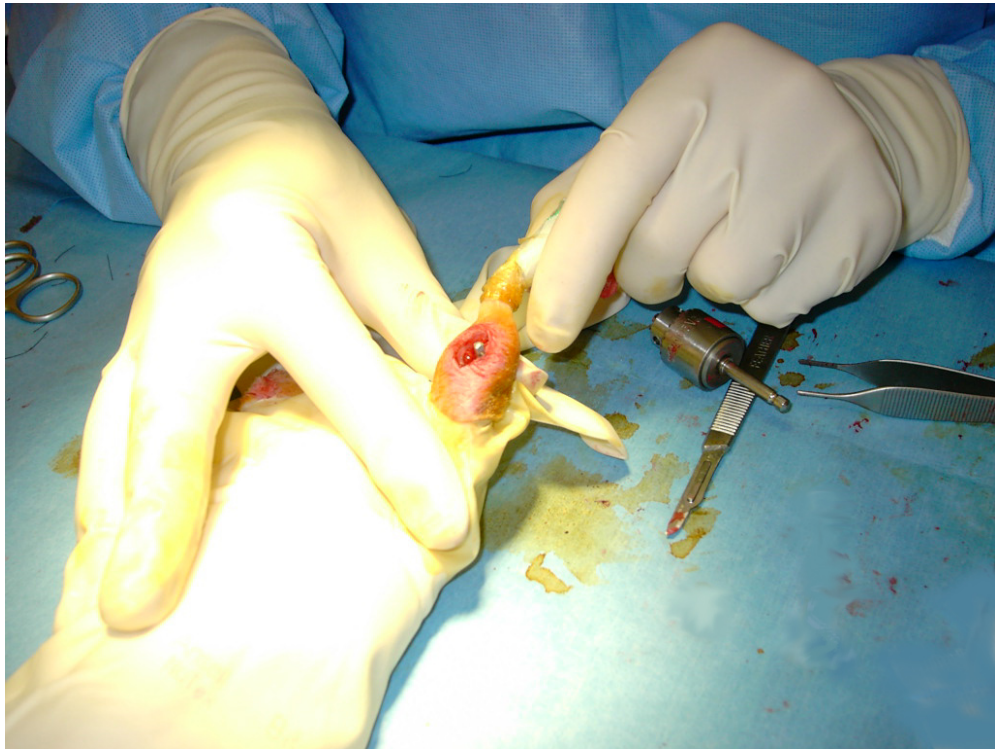


Abb. 10: Implantation der Stahlschrauben

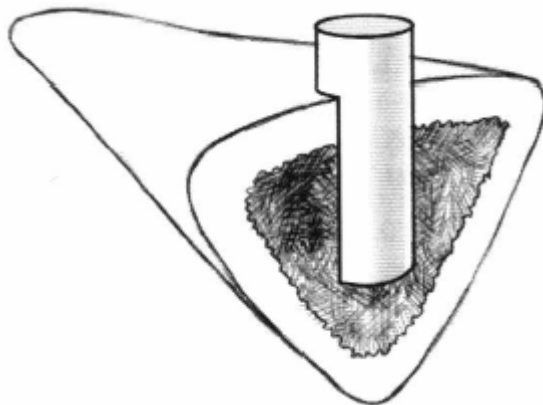


Abb. 11: Schema des implantierten PMMA-Zementstabes

-Perioperative Gabe der osteogenetischen Faktoren und der Kontroll-Lösung:

Unmittelbar nach dem Einsetzen der Implantate und dem Verschließen der Hautnähte wurde jeweils 7 Tieren die Kontroll-Lösung gewichtsadaptiert in einer Dosis von 1,2 ml/kg KG, 8 Tieren PTH(1-34)human in einer Dosis von 60 µg/kg KG und 8 Tieren Bisphosphonat (Alendronat, Fosamax®) in einer Dosis von 200µg/kg KG subkutan in die Nackenfalte gespritzt.

-Postoperatives Verfahren:

Nach OP-Ende wurden jeweils zwei Tiere in einem Makrolon-Typ IV Käfig unter den oben genannten Bedingungen für 2 Wochen in der Tierhaltung Ost des Universitätsklinikum-Eppendorf gehalten.

-Postoperative Gabe der osteogenetischen Faktoren:

48 Stunden nach Beenden des Einsetzens der Implantate wurden, von den verbliebenen 16, bisher mit Kontroll-Lösung oder Experiment-Lösungen unbehandelten, Tieren jeweils 8 Tiere mit PTH(1-34)human in der Dosis 60 µg/kg KG und je 8 Tiere mit Bisphosphonat (Alendronat, Fosamax®) in der Dosis 200 µg/kg KG durch eine subkutane Injektion behandelt.

-Entnahme der Tibiae und Implantate:

2 Wochen nach Einsetzen der Implantate wurden die Tiere durch Einleiten von CO₂ in einen Glasbehälter getötet. Die toten Tiere wurden ein letztes Mal gewogen und anschließend die hinteren Extremitäten im Knie- und Sprunggelenk gebrochen, die Weichteile entfernt und die Tibiae inklusive der Implantate entnommen. Die Tibiae wurden in Biopsiebehälter gegeben und verwahrt. Den rechten Tibiae wurde zusätzlich 4% Formaldehyd-Lösung zur Fixation zugegeben, die linken Tibiae mit den implantierten Stahlschrauben unmittelbar in einem Kühlfach bei -40°C gelagert.

3.10 Mechanische Tests

Einen Tag vor Beginn der mechanischen Tests wurden die Präparate aus dem Kühlfach (-40°C) genommen und bei Raumtemperatur gelagert. Die mechanischen Tests fanden im Zentrum Biomechanik des Universitätsklinikum-Eppendorf, unter Aufsicht und mit Hilfe des Ingenieurs Dr. M. Hahn, statt.

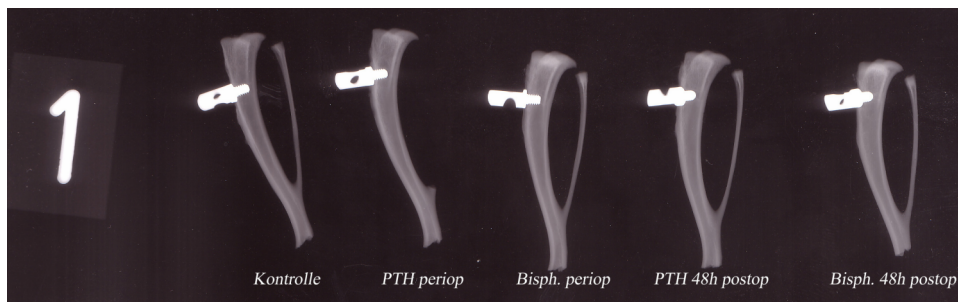


Abb. 12: Kontaktradiographie der Tibiae mit implantierten Stahlschrauben

-Aufbau des Pull-out-Versuchs und Durchführung

Zu Beginn wurden Tibia und Schrauben erneut von allen Geweberesten gesäubert und dann in einer, in allen 3 Ebenen verstellbaren, Stahlhalterung fixiert. Verbunden wurde die Schraube über die sich im Kopfteil der Schraube befindliche Öffnung durch eine ca. 10 cm lange Metalldrahtklammer mit einem elektrischen Kraftverstärker (Modulares Prüfsystem Zwick® Z 2.5) (Abb. 13 und 14). Dieser war an einen Computer angeschlossen, um die Zug-Kraft-Veränderungen messen und darstellen zu können („Zugkraft in Newton“).

Das ganze System wurde unmittelbar vor Beginn der Versuche getestet und kalibriert. Der Pull-Out-Wert wurde als der maximale Wert gemessen, der beim Lösen der Stahlschraube vom Knochen entstand. Die Halterung inkl. der Tibiae wurde jeweils so ausgerichtet, dass sich die Schraube vertikal zur Zugrichtung des Kraftverstärkers befand, um mögliche, den maximalen Wert beeinflussende, Störfaktoren zu minimieren. Nach Beenden der mechanischen Tests wurden die Tibiae wieder bei -40°C eingelagert, um in einem späteren Versuch deren Ash-weight bestimmen zu können.

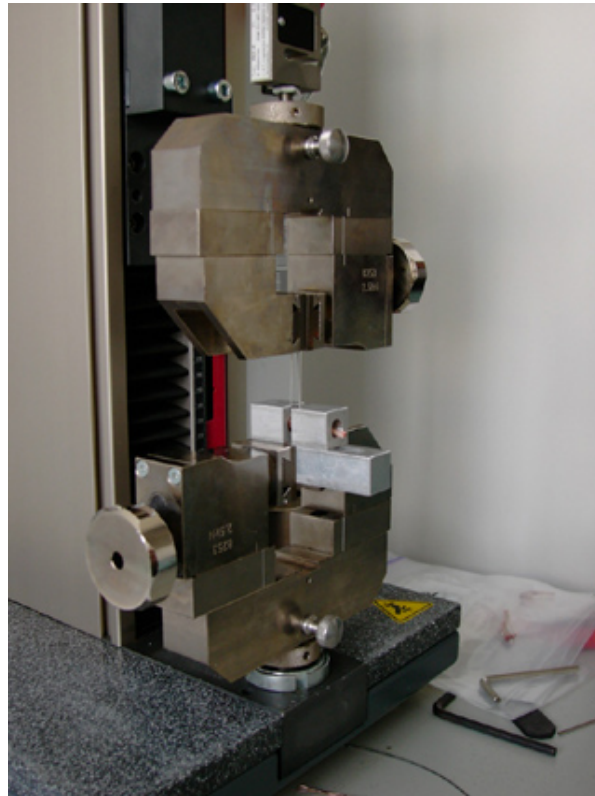


Abb. 13: Modulares Prüfsystem ZWICK® Z 2.5

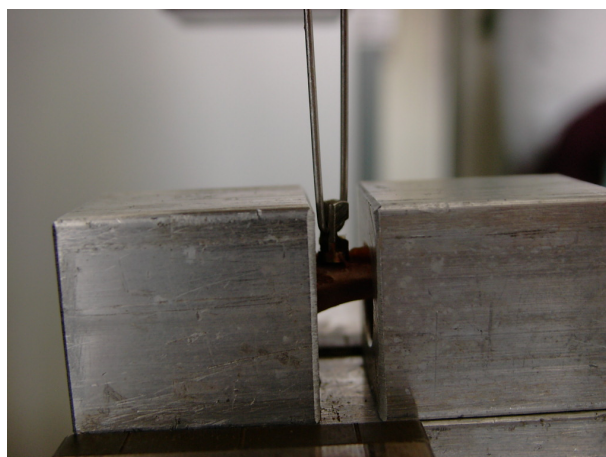


Abb. 14: Fixierte Stahlschraube vor Durchführung des Pull-out-Versuchs

3.11 Histologische Untersuchung

Die in einer 4% Formaldehyd-Lösung fixierten rechten Tibiae wurden an das Universitätsklinikum Linköping, Schweden geschickt, wo die histologische Bearbeitung und histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt wurden.

-Anfertigung der Paraffinschnitte: (nach Junqueira, Carneiro)

- Fixation

Fixiert wurden die Tibiae in einer 4% Formaldehyd-Lösung direkt nach der Entnahme

- Dekalzifikation und Zurechtschneiden der Tibiae

Die Tibiae wurden für ca. 4 Wochen in eine 10% EDTA-Lösung eingelegt, um den Knochen für spätere Untersuchungen zu entkalken. Vorher wurden die Tibiae auf entsprechende Größe zurechtgeschnitten.

- Entwässern

Um das Gewebe von Fixierungsmittel und Wasser zu befreien, wurde es schrittweise in eine aufsteigende Alkoholreihe gegeben: 70% bis 100% Äthylalkohol.

- Auswaschung

Das Gewebe wurde in Xylol, ein organisches Lösungsmittel, gegeben und der Alkohol ausgewaschen.

- Einbetten

Anschließend wurde das Gewebe bei 58° - 60°C für mehrere Stunden in flüssiges Paraffin eingebracht.

- Vorbereitung und Schneiden des Gewebes

Sägeblöcke wurden angefertigt, geschliffen, poliert und Schnitte der Schichtdicke 6µm hergestellt. Diese wurden in ein heißes Wasserbad gegeben und anschließend für 12 Stunden bei 45°C erneut fixiert.

- Histologische Färbung

Die Präparate wurden dann nach der Haematoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) gefärbt:

1. De-Paraffinasation:

--- Xylen (2x 10 Min)

→ Alkohol abs. (5 Min)

→ Alkohol 95 % (3 Min)

→ Aqua dest. (10 Min)

2. 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)

3.12 Histomorphometrische Auswertung der Ergebnisse

Die histomorphometrische Untersuchung und Auswertung der Präparate bzw. der rechten Tibiae führten wir in Linköping, Schweden durch. Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop Olympus® BX-51 mit integrierter Digitalkamera und der Software Olympus® DP-Soft 3.2 analySIS image processing, Media Cybernetics (Abb. 15).

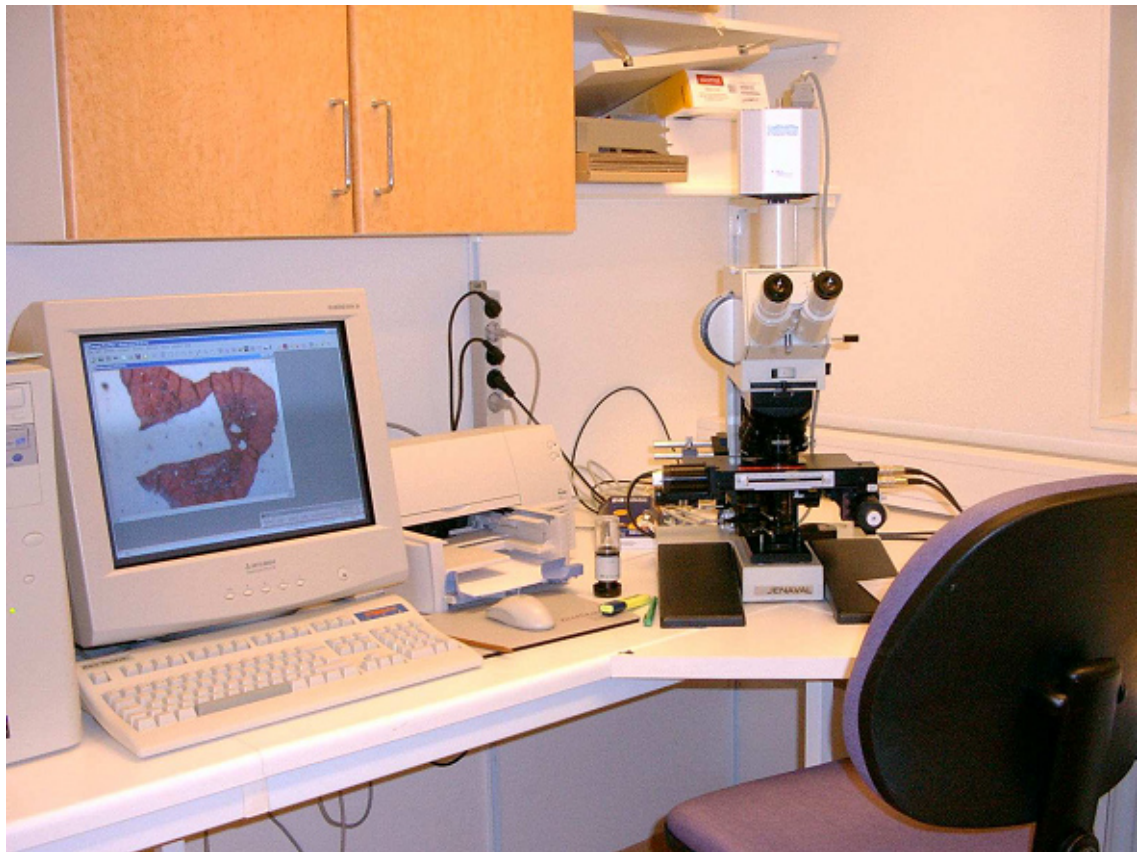


Abb. 15: Arbeitsplatz für histomorphometrische Analysen

-Implantat-Knochen-Kontakt:

Mit Hilfe der Image Software, Olympus® DP-Soft 3.2 analySIS image processing, Media Cybernetics wurden, um die Länge des Implantat-Knochen-Kontakts als prozentualen Wert zu erhalten, zuerst die Gesamtlängen der Strecken a und b gemessen und anschließend mit den Teilstrecken $c - n$, die einen direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat aufgewiesen haben, d.h. kein fibröses Bindegewebe ist unter 20-facher Vergrößerung erkennbar, ins Verhältnis gebracht (Abb.16 - 22).

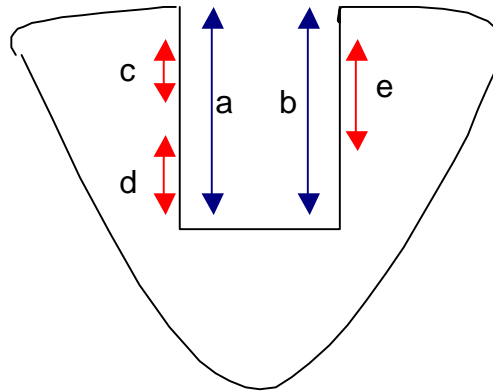


Abb. 16: Schema zur Messung des Implantat-Knochen-Kontaktes

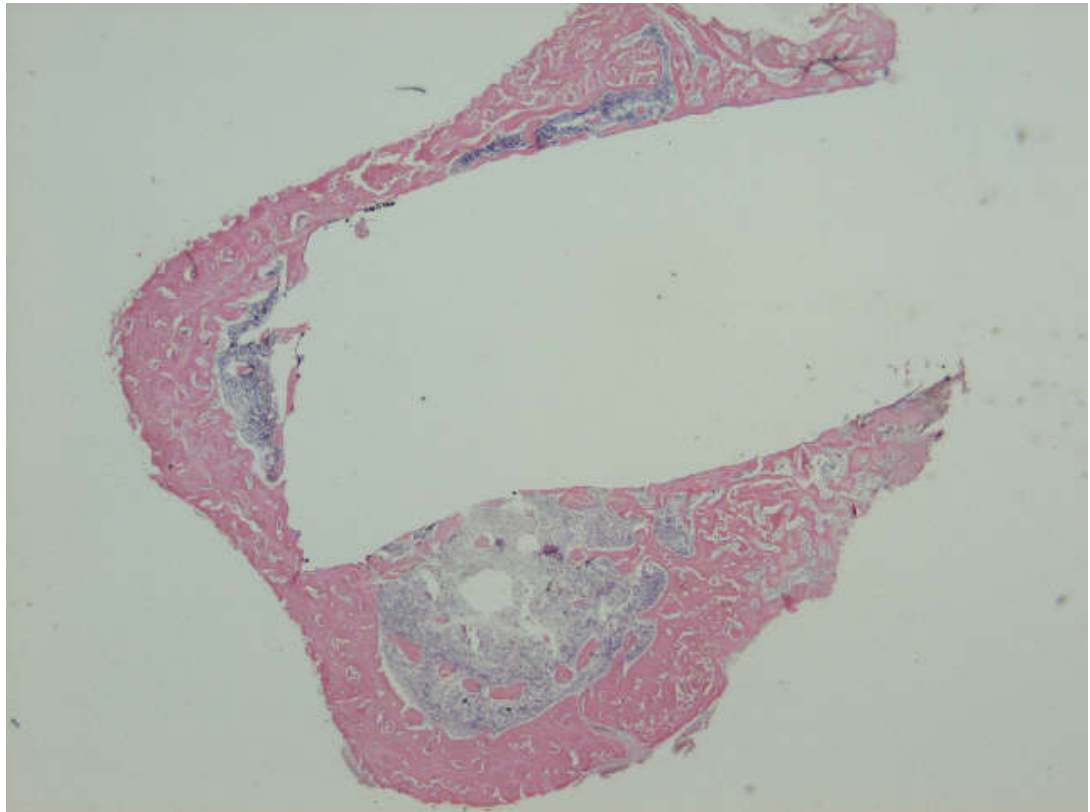


Abb. 17: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)

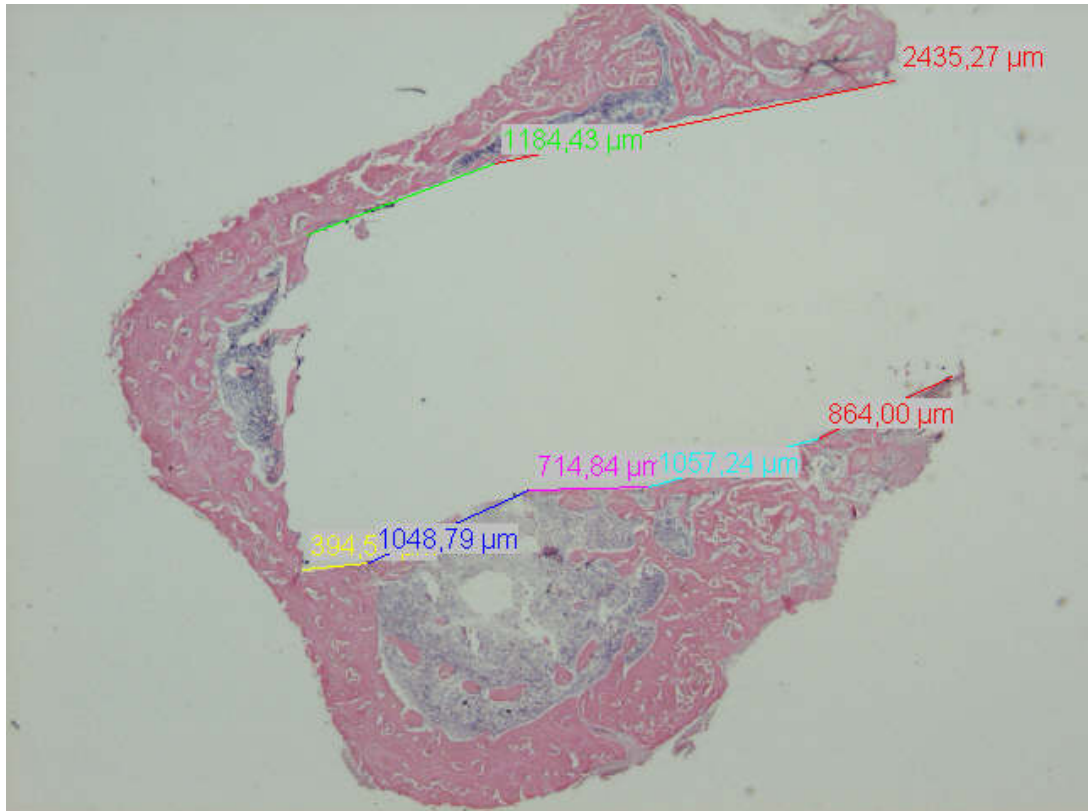


Abb. 18: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)

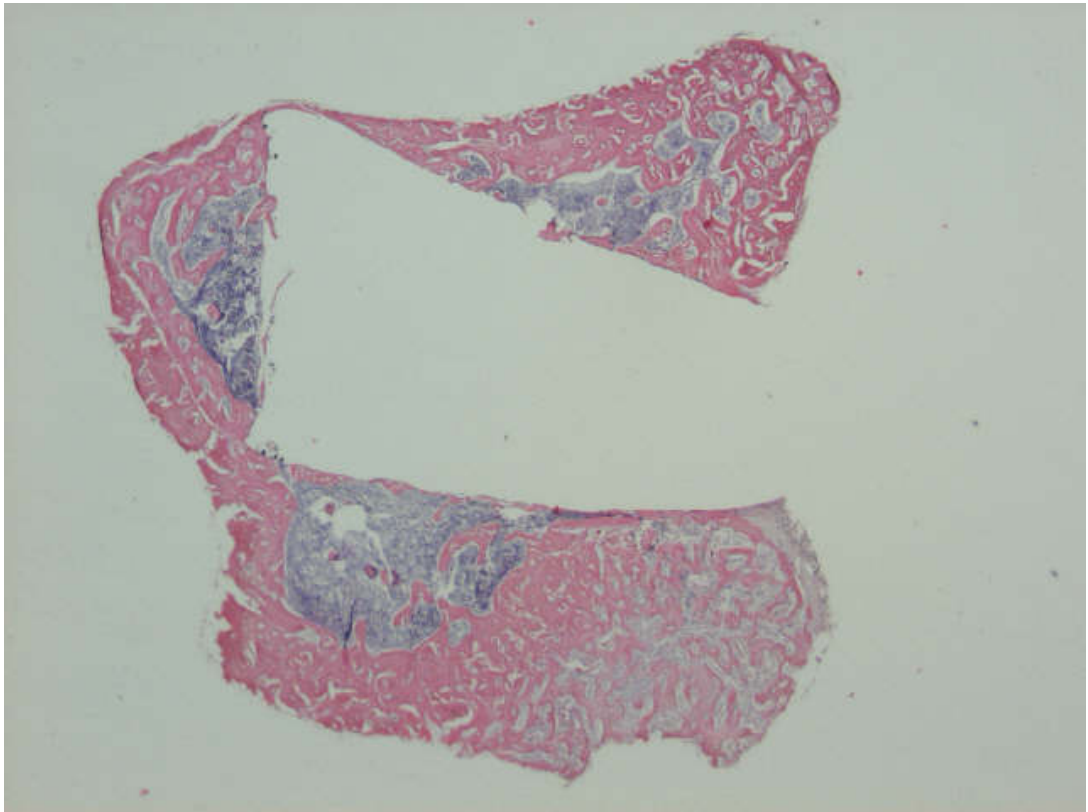


Abb. 19: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)

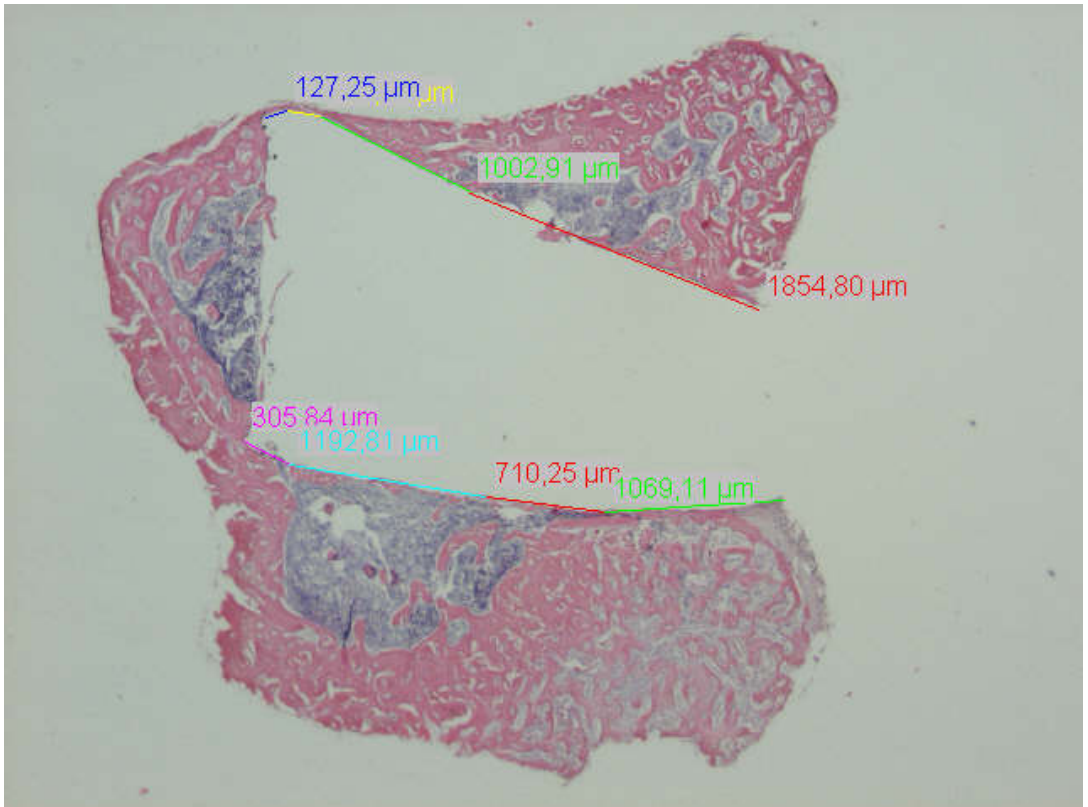


Abb. 20: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes(10-fache Vergrößerung)

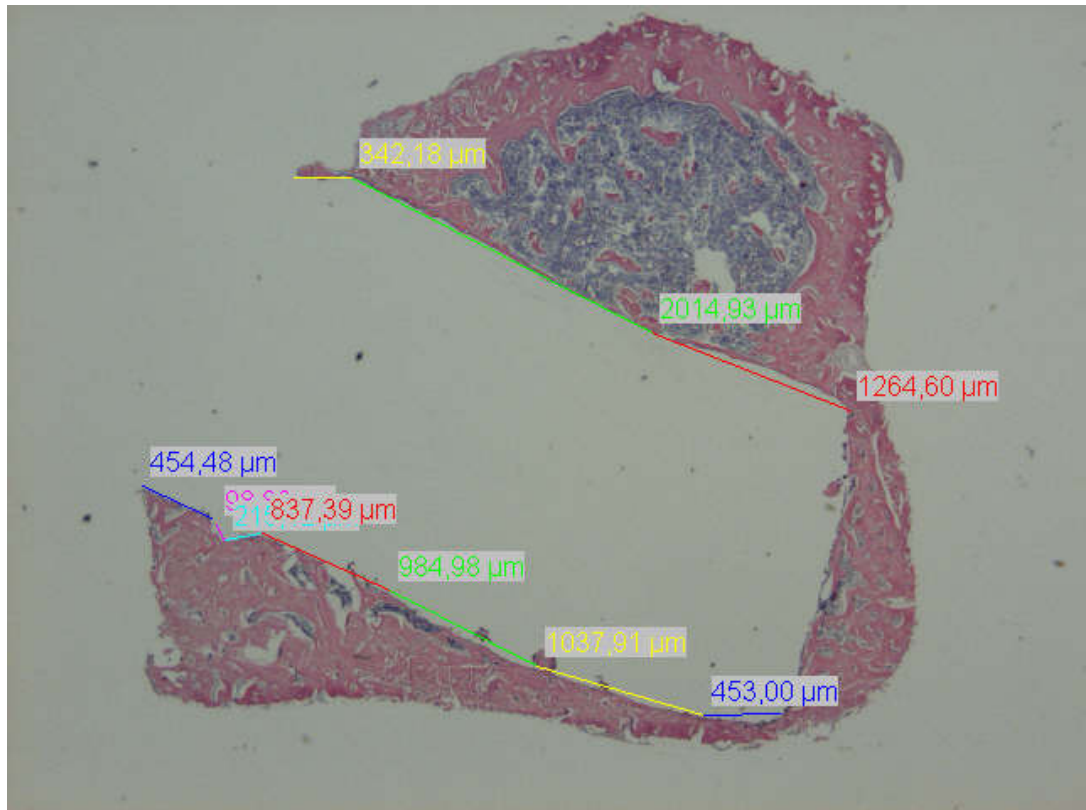


Abb. 21: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (10-fache Vergrößerung)

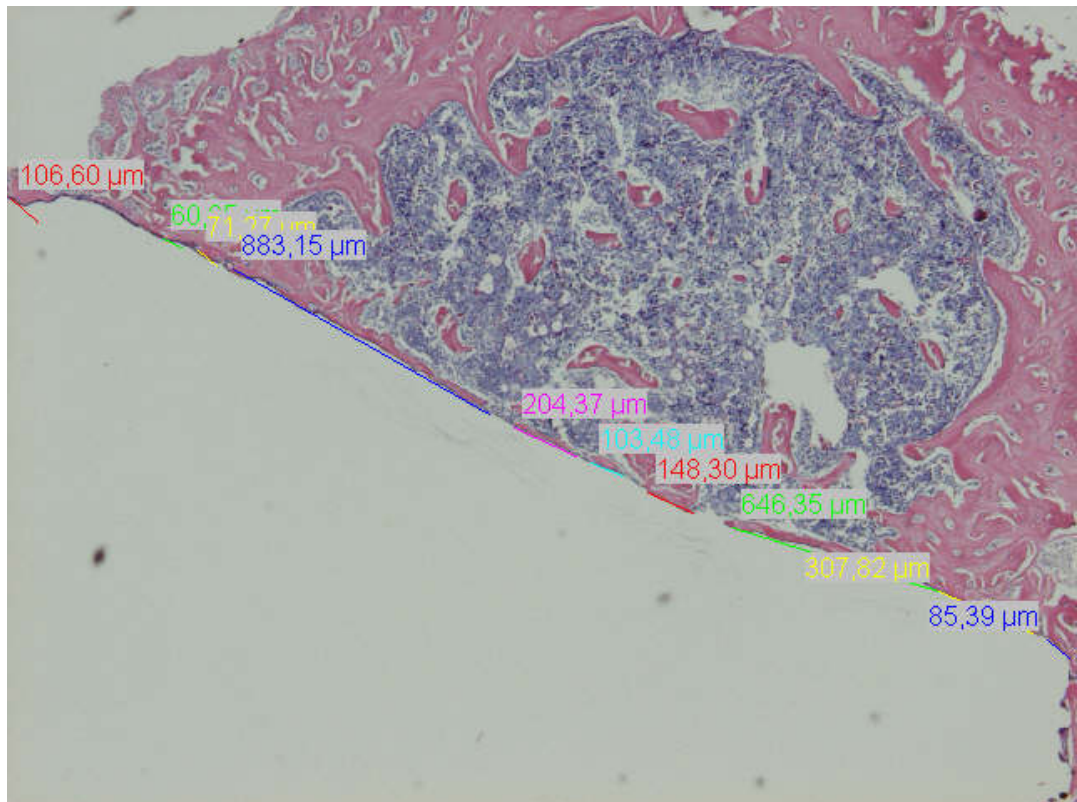


Abb. 22: Beispiel zur Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes (20-fache Vergrößerung)

-Knochendichtebestimmung:

Mit dem Merz-Grid (Abb. 23), einem speziellen Integrationsokular, lässt sich die Dichte der Knochenspongiosa errechnen. P steht hierbei für die Anzahl von 36 möglichen Schnittpunkten, die in cortikalem Knochen liegen. N dagegen steht für die Anzahl der Schnittpunkte mit der Cortikalisoberfläche. Die Merz-Grid-Konstante d ist abhängig von der jeweiligen Vergrößerung und beträgt hier bei einer Vergrößerung von $50 \times 1,25$ 0,03 mm. Um eine möglichst große Fläche des Tibiaquerschnitts (periimplantär) bzw. den gesamten Femurquerschnitt mit dem Merz-Grid auszufüllen, wurde eine Vergrößerung von $50 \times 1,25$ gewählt.

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

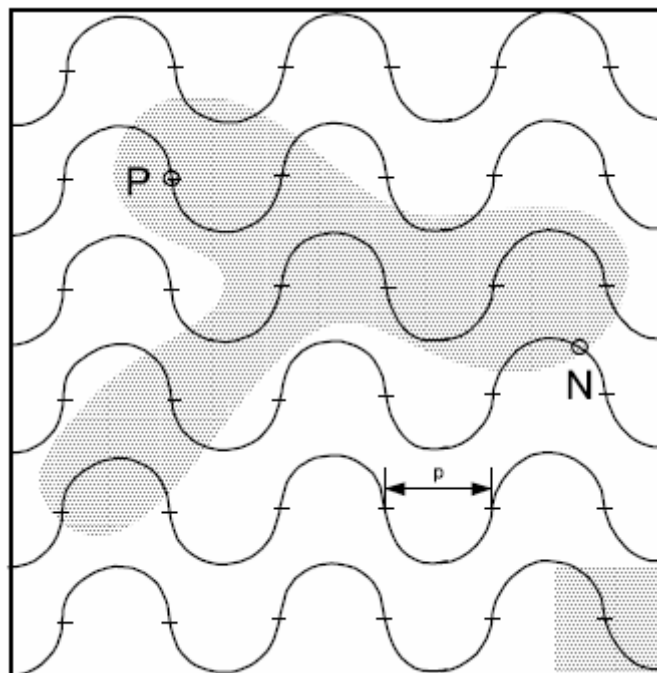


Abb.23: Merz-Grid

- Volumetrische Dichte der Spongiosa V_v

Die volumetrische Dichte der Spongiosa V_v [%] ist der prozentuale Anteil der knöchernen Interzellulärsubstanz am Gesamtvolumen. Mit zunehmendem Alter nimmt V_v stetig ab und führt somit schrittweise zu niedrigeren Werten, wie sie für die senile Atrophie charakteristisch sind.

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

- Oberflächendichte S_v

Um die in Prozenten errechneten Umbaudaten der Trabekeloberfläche in absolute Werte innerhalb eines Einheitsvolumens umwandeln zu können, wird die Oberflächendichte S_v (mm^2 Trabekeloberfläche/ cm^3 Gesamtvolumen) benötigt. Auch die Oberflächendichte S_v zeigt im Alter stetig abnehmende Werte.

$$S_v [\text{mm}^2/\text{cm}^3] = \frac{N}{F} \cdot ksv$$

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

- Spezifische Oberfläche S/V

Die spezifische Oberfläche S/V ist ein zum mittleren Bälkchendurchmesser reziproker Wert, der im Mittel, auch mit zunehmendem Alter, konstant bleibt, aber zu starker Streuung neigt. Dies lässt sich durch die Aufspaltung in zwei statistisch unterschiedliche Populationen erklären. Bei der einen reduziert sich die Anzahl der Bälkchen, die Trabekel nehmen an Umfang zu und ordnen sich daher auch anders an. Es wird angenommen, dass diese Veränderungen auf einer physiologischen Reaktion gegen eine drohende Insuffizienz des atrophierenden Knochens beruhen. Die andere Population zeigt, aufgrund einer stetigen Verkleinerung des mittleren Bälkchendurchmessers, einen Substanzverlust in V_v . Die Struktur der Bälkchen ändert sich hier aber nicht.

$$\frac{S}{V} = \frac{N}{P} \cdot ksv$$

$$ksv [\text{mm}^2/\text{mm}^3] = \frac{4}{\pi \cdot d}$$

3.13 Auswertung und Statistik

Ausgewertet wurden die Untersuchungsergebnisse mit der Statistiksoftware StatView®, mit der Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und Balkendiagramme sowie ANOVA-Tabellen erstellt wurden.

3.14 Bestimmen des Ash-weight

Um herauszufinden, ob sich die systemische Gabe von osteogenetischen Faktoren auf die Knochenmasse auswirkt, haben wir, nachdem den Tibiae im Pull-out-Versuch die Stahlschrauben entfernt wurden, das Ash-weight (Asche-Gewicht) der Tibiae bestimmt. Dazu wurde jeweils ein 3 cm langes Segment der proximalen Tibiae rechtwinklig zur Längsachse abgetrennt und deren Gewicht vor und nach der Veraschung bei 700°C für 24 Stunden bestimmt.

4. Ergebnisse

Von den 40 Versuchstieren verstarb eines bereits während der Narkose. Bei den anderen Tieren verliefen Implantation, Wundheilung und postoperativer Verlauf komplikationslos. Die Tiere zeigten keine Anzeichen von Infektionen (Rötung, Schwellung) oder verzögerter Wundheilung. Eines der Tiere musste von der Knochendichtebestimmung ausgeschlossen werden, da der PMMA-Zementstab postoperativ innerhalb der 2 Wochen Stallhaltung dislozierte. Bei den Messungen des Implantat-Knochen-Kontaktes mussten zwei Tiere ausgeschlossen werden, weil, wie bereits erwähnt, bei dem ersten Tier der PMMA-Zementstab postoperativ dislozierte und bei dem zweiten Tier der histologische Schnitt aufgrund schlechter Qualität nicht auswertbar war. Von den mechanischen Tests wurden insgesamt drei Versuchstiere ausgeschlossen, da bei zwei Tieren die Stahlschrauben postoperativ dislozierten und bei dem dritten Tier die Stahlschraube schräg zur Achse der Tibiavorderkante implantiert wurde und so zusätzlich wirkende Scherkräfte das Messergebnis hätten beeinflussen können.

4.1 Ergebnisse: Implantat-Knochen-Kontakt

Den Auswertungen zugrunde gelegt wurden Untersuchungen von Skripitz und Aspenberg 1998, nach denen der Nachweis einer lichtmikroskopisch nachweisbaren dünnen Schicht von Bindegewebszellen zwischen Implantat und Knochenzellen dazu führt, dass diese Knochen-Implantat-Strecke nicht als durchgehender Kontakt gewertet werden kann. Nach diesen Kriterien sind auch wir bei unseren histologischen Untersuchungen verfahren.

Die Auswertung der Histomorphometrie mittels ANOVA-Tabelle und Fischer's PLSD-Test mit einem Signifikanzlevel von 0,05 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Bisphosphonat-48h-postop.-Gruppe und der Kontrollgruppe (p-value = 0,0116). Der Implantat-Knochen-Kontakt-Anteil lag dabei in der Bisphosphonat-48h-postop.-Gruppe nach zwei Wochen bei nur 8,517 % und besaß somit eine 2,4-fach geringere Kontaktfläche als die Kontrollgruppe mit 20,771 % Implantat-Knochen-Kontakt-Anteil. Ebenso zeigte die Auswertung einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Bisphosphonat-48h-postop.-Gruppe mit der Bisphosphonat-periop.-Gruppe (p-value = 0,0081) sowie mit der

PTH-periop.-Gruppe (p-value = 0,0007) und der PTH-48-postop.-Gruppe (p-value = 0,0106). Die Kontaktfläche der PTH-periop.-Gruppe lag bei 25,3 % und betrug somit das 2,97-fache des Wertes der Bisphosphonat-48h-postop.-Gruppe. Die einmalige Gabe von Bisphosphonaten 48 h nach der Operation hat sich also negativ auf die Osseointegration des Implantats ausgewirkt. Im Vergleich der restlichen Gruppen untereinander konnte keine Signifikanz festgestellt werden (p-value > 0,05) (Abb. 24 und Tab. 4 – 6).

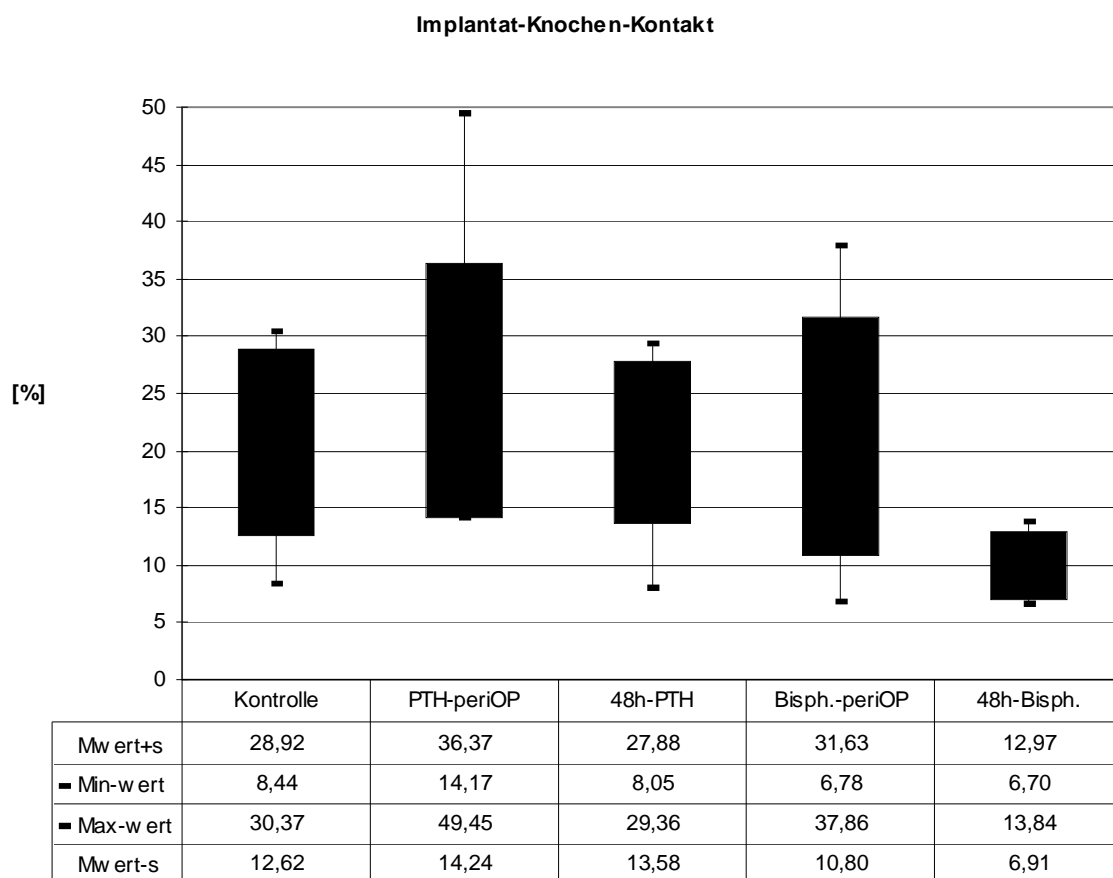


Abb. 24: Diagramm der Werte des Implantat-Knochen -Kontaktes

Tabelle 4: Ergebnisse der Bestimmung des Implantat-Knochen-Kontaktes

Präparat	Behandlung	Zeitpunkt	Länge total [µm]	Implant-Knochen-Kontakt [µm]	% Knochen	Mittelwert
A1	Kontrollsg	periop.	----	----	----	
A2	Kontrollsg	periop.	6148,9	1867,75	30,37	
A3	Kontrollsg	periop.	6269,5	847,11	13,51	
A4	Kontrollsg	periop.	7773,56	1280,41	16,74	
A5	Kontrollsg	periop.	6293	1582,79	25,14	20,277
A6	Kontrollsg	periop.	4351,08	367,33	8,44	
A7	Kontrollsg	periop.	5956,65	1710,79	28,72	
A8	Kontrollsg	periop.	4789,74	1076,775	22,48	
B1	PTH	periop.	6832,98	3379,2	49,45	
B2	PTH	periop.	8722,36	1236,1	14,17	
B3	PTH	periop.	4419,48	1234,91	27,94	
B4	PTH	periop.	4349,55	627,87	15,46	
B5	PTH	periop.	3933,63	973,61	24,75	25,31
B6	PTH	periop.	5587,44	1592,31	28,5	
B7	PTH	periop.	4545,86	962,97	21,18	
B8	PTH	periop.	4042,21	848,96	21	
C1	Bisphosph.	periop.	7208,61	855,97	11,87	
C2	Bisphosph.	periop.	6142,04	2325,86	37,86	
C3	Bisphosph.	periop.	3447,61	1119,89	32,4	
C4	Bisphosph.	periop.	2755,13	638,53	23,17	
C5	Bisphosph.	periop.	10124,44	2471,89	24,41	21,22
C6	Bisphosph.	periop.	7789,19	528,72	6,78	
C7	Bisphosph.	periop.	5768,29	867,12	15,03	
C8	Bisphosph.	periop.	5396,14	985,6	18,2	
D1	PTH	48h	7703,38	1664,61	21,6	
D2	PTH	48h	8145,88	1808,28	22,22	
D3	PTH	48h	5423,9	1261,93	23,26	
D4	PTH	48h	7899,57	2319,42	29,36	
D5	PTH	48h	7646,98	1938,98	25,36	20,73
D6	PTH	48h	5238,95	622,46	11,8	
D7	PTH	48h	7828,16	1895,7	24,21	
D8	PTH	48h	7767,53	625,53	8,05	
E1	Bisphosph.	48h	4501,07	Nur Bindegewebsschicht	----	
E2	Bisphosph.	48h	8725,42	1140,14	13,07	
E3	Bisphosph.	48h	5087,29	490,23	9,636	
E4	Bisphosph.	48h	7840,84	754,68	9,62	
E5	Bisphosph.	48h	5207,67	721,16	13,84	9,94
E6	Bisphosph.	48h	7100,16	479,27	6,75	
E7	Bisphosph.	48h	7899,01	529,63	6,7	
E8	Bisphosph.	48h	keine Messung möglich			

Tabelle 5: Ergebnisse der Auswertung durch die Statistiksoftware StatView®

ANOVA Table for percent contact

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Column 11	4	1161,038	290,260	3,827	,0116	15,308	,851
Residual	33	2502,920	75,846				

Tabelle 6: Ergebnisse der Auswertung durch Fisher's PLSD-Test

Fisher's PLSD for percent contact
 Effect: Column 11
 Significance Level: 5%

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
Bisph 48h, Bisph perop	-12,698	9,170	,0081	S
Bisph 48h, Control	-12,255	9,471	,0128	S
Bisph 48h, PTH perop	-12,216	9,170	,0106	S
Bisph 48h, PTH 48h	-16,790	9,170	,0007	S
Bisph perop, Contol	,444	9,170	,9222	
Bisph perop, PTH 48h	,482	8,859	,9124	
Bisph perop, PTH perop	-4,091	8,859	,3543	
Control, PTH 48h	,039	9,170	,9932	
Control, PTH perop	-4,535	9,170	,3217	
PTH 48h, PTH perop	-4,574	8,859	,3012	

4.2 Ergebnisse: Knochendichte

Untersucht wurden mit Hilfe des Merz-Grid die volumetrische Dichte (%), die Oberflächendichte (mm^2/cm^3) und die spezifische Oberfläche (mm^2/mm^3).

Bei den Auswertungen mittels ANOVA-Tabelle und Fischer's PLSD-Test ergab sich im Vergleich der Gruppen untereinander für keinen der untersuchten Werte eine Signifikanz ($p\text{-value} < 0,05$) (Abb. 25 und Tab. 7).

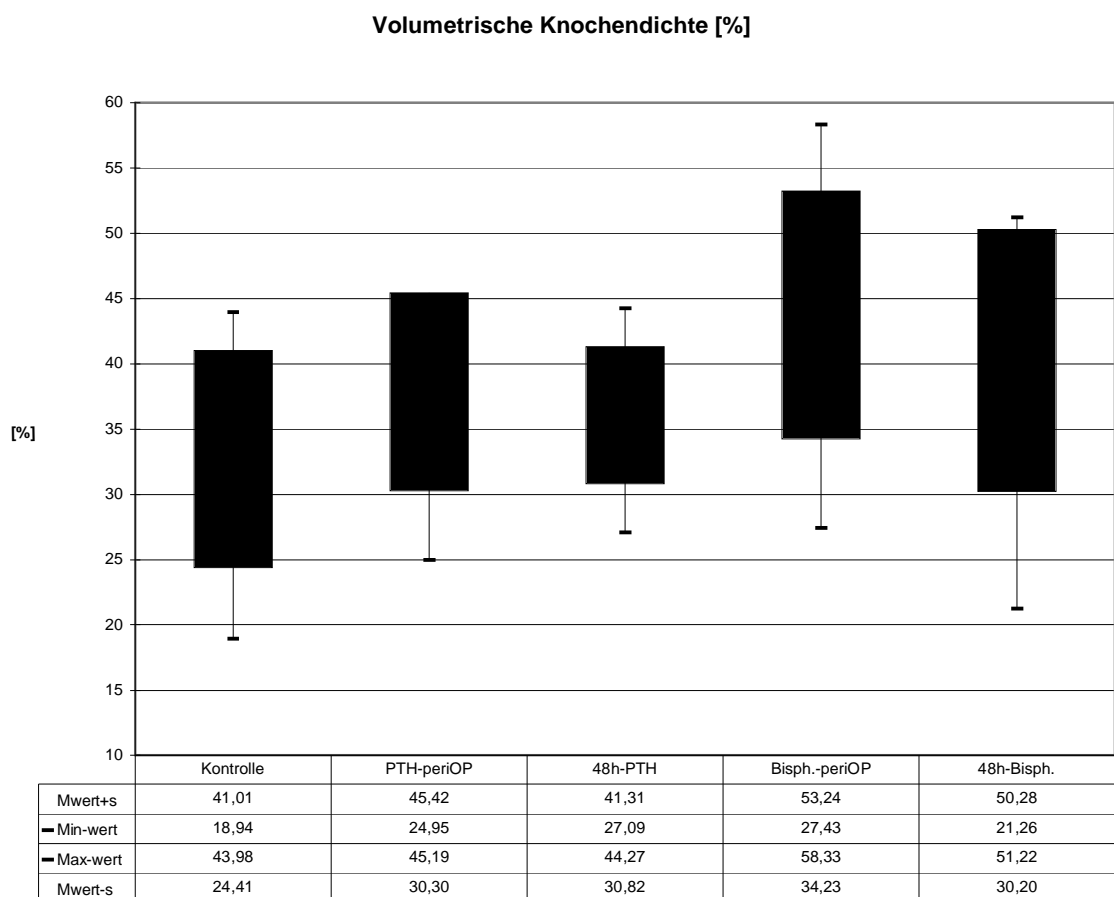


Abb. 25: Diagramm der volumetrischen Knochendichtewerte

Tabelle 7: Ergebnisse der Knochendichtebestimmung

Behandlung	50x1,25	Total Points Ce	Vol. Dichte Vv [%]	Oberflächendichte SV[mm ² /cm ³]	Spez. Oberfläche[mm ² /cm ³]
Kontrollsg	A1				
Kontrollsg	A2	454	18,94	141471,1	77,0
Kontrollsg	A3	537	33,15	182340,5	55,3
Kontrollsg	A4	666	40,54	346231,8	87,7
Kontrollsg	A5	488	32,17	293882,0	42,4
Kontrollsg	A6	357	43,98	431486,7	98,9
Kontrollsg	A7	432	33,33	235785,1	70,7
Kontrollsg	A8	391	26,85	250789,6	94,6
		Mittelwert:	32,71	268855,3	75,2
PTH peri	B1	521	24,95	204347,1	84,9
PTH peri	B2	648	41,05	442097,1	107,7
PTH peri	B3	422	27,96	163870,6	50,0
PTH peri	B4	489	45,19	379782,4	86,6
PTH peri	B5	396	39,65	225067,6	56,8
PTH peri	B6	468	36,75	308334,4	83,9
PTH peri	B7	312	43,27	332719,0	79,9
PTH peri	B8	227	44,05	271152,9	78,1
		Mittelwert:	37,86	290921,4	78,5
	50x1,25	Total Points Ce	Vol. Dichte Vv [%]	Oberflächendichte SV[mm ² /cm ³]	Spez. Oberfläche[mm ² /cm ³]
Bisph. Peri	C1	576	27,43	195259,5	71,2
Bisph. Peri	C2	504	50,39	421044,8	83,5
Bisph. Peri	C3	311	46,30	285562,0	64,3
Bisph. Peri	C4	216	58	339923,52	58,3
Bisph. Peri	C5	677	39,29	390286,4	100,4
Bisph. Peri	C6	502	35,86	357046,0	100,0
Bisph. Peri	C7	487	43,94	272837,0	64,3
Bisph. Peri	C8	484	48,35	353677,7	76,2
		Mittelwert:	43,74	326954,6	77,3
PTH 48h	D1	532	39,66	399262,8	102,2
PTH 48h	D2	644	32,76	452576,4	139,0
PTH 48h	D3	468	37,18	309241,2	83,2
PTH 48h	D4	609	27,09	421639,2	96,3
PTH 48h	D5	558	44,27	209996,1	49,0
PTH 48h	D6	468	35,26	391766,0	111,1
PTH 48h	D7	645	39,22	410004,1	105,0
PTH 48h	D8	538	33,09	260149,6	78,9
		Mittelwert:	36,07	356829,43	95,58
	50x1,25	Total Points Ce	Vol. Dichte Vv [%]	Oberflächendichte SV[mm ² /cm ³]	Spez. Oberfläche[mm ² /cm ³]
Bisph. 48h	E1	456	39,91	156404,1	46,4
Bisph. 48h	E2	828	21,26	231684,5	109,0
Bisph. 48h	E3	396	37,12	319381,6	86,0
Bisph. 48h	E4	647	38,18	335993,8	88,1
Bisph. 48h	E5	396	50,00	308664,1	61,7
Bisph. 48h	E6	576	51,22	495148,7	96,7
Bisph. 48h	E7	540	44	363109,05	82,4
Bisph. 48h	E8				
		Mittelwert:	40,24	315769,4	81,5

4.3 Ergebnisse: Mechanische Stabilität

Die Auswertung der Werte für die maximal benötigte Kraft (max. value) in Newton erfolgte auch hier mittels ANOVA und ergab signifikante Unterschiede (ANOVA: p-value = 0,179) (Tab. 9) im Vergleich beider Bisphosphonat-Gruppen mit sowohl der Kontrollgruppe, als auch der PTH-48h-postop.-Gruppe. Bei der Bisphosphonat-periop.-Gruppe wurde mit 70,828 N eine 1,55-fach stärkere Zugkraft benötigt als in der Kontrollgruppe mit 45,682 N. In der Bisphosphonat-48h-postop.-Gruppe wurde im Mittel eine Zugkraft von 70,537 N benötigt. Der Vergleich beider PTH-Gruppen mit der Kontrollgruppe und untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 26 und Tab. 8).

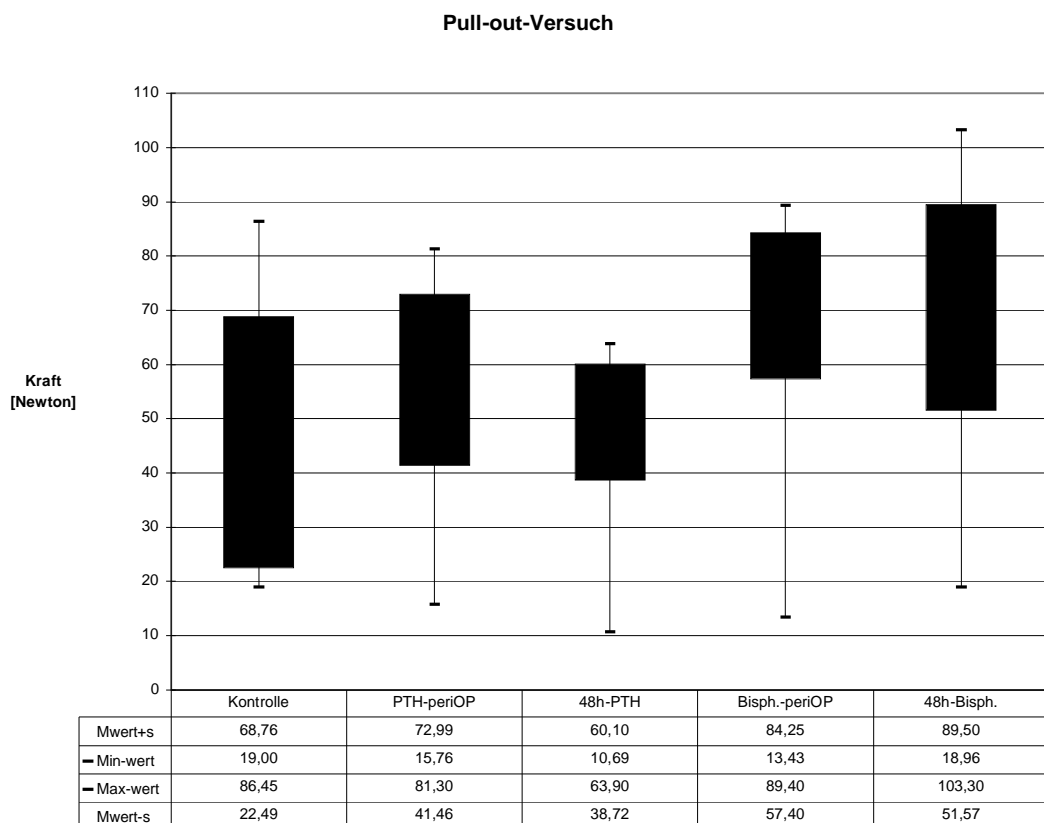


Abb. 26: Diagramm der Pull-out-Versuchswerte

Tabelle 8: Ergebnisse der Pull-out-Versuche

Gruppe	Präparat	Kraft [Newton]	Mittelwert
Kontrolle	A1	-----	-----
Kontrolle	A2	28,7	
Kontrolle	A3	86,45	
Kontrolle	A4	48,12	45,62833333
Kontrolle	A5	19	
Kontrolle	A6	-----	-----
Kontrolle	A7	47,7	
Kontrolle	A8	43,8	
PTH periop.	B1	-----	-----
PTH periop.	B2	49,7	
PTH periop.	B3	81,3	
PTH periop.	B4	60,9	57,22857143
PTH periop.	B5	31,4	
PTH periop.	B6	68,2	
PTH periop.	B7	59	
PTH periop.	B8	50,1	
Bisph. periop.	C1	51,6	
Bisph. periop.	C2	76,1	
Bisph. periop.	C3	80,7	
Bisph. periop.	C4	-----	70,82857143
Bisph. periop.	C5	76,2	
Bisph. periop.	C6	58,1	
Bisph. periop.	C7	63,7	
Bisph. periop.	C8	89,4	
PTH 48h postop.	D1	46,5	
PTH 48h postop.	D2	47,3	
PTH 48h postop.	D3	40,5	
PTH 48h postop.	D4	50,6	49,4125
PTH 48h postop.	D5	63	
PTH 48h postop.	D6	51,6	
PTH 48h postop.	D7	63,9	
PTH 48h postop.	D8	31,9	
Bisph. 48h postop.	E1	92,6	
Bisph. 48h postop.	E2	64,6	
Bisph. 48h postop.	E3	46	
Bisph. 48h postop.	E4	65,2	70,5375
Bisph. 48h postop.	E5	73,9	
Bisph. 48h postop.	E6	63,2	
Bisph. 48h postop.	E7	55,5	
Bisph. 48h postop.	E8	103,3	

Tabelle 9: Ergebnisse der Auswertung durch die Statistiksoftware StatView®

ANOVA Table for max. value [newton]

Row exclusion: PTH, bisposp, endos skruv.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Group	4	3873,528	968,382	3,505	,0179	14,019	,808
Residual	31	8565,484	276,306				

4.4 Ergebnisse: Ash-weight

Bei der Bestimmung des Ash-weight der untersuchten Tibiae, ergaben sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe, noch unter den behandelten Versuchsgruppen selbst (Abb. 27 und Tab. 10).

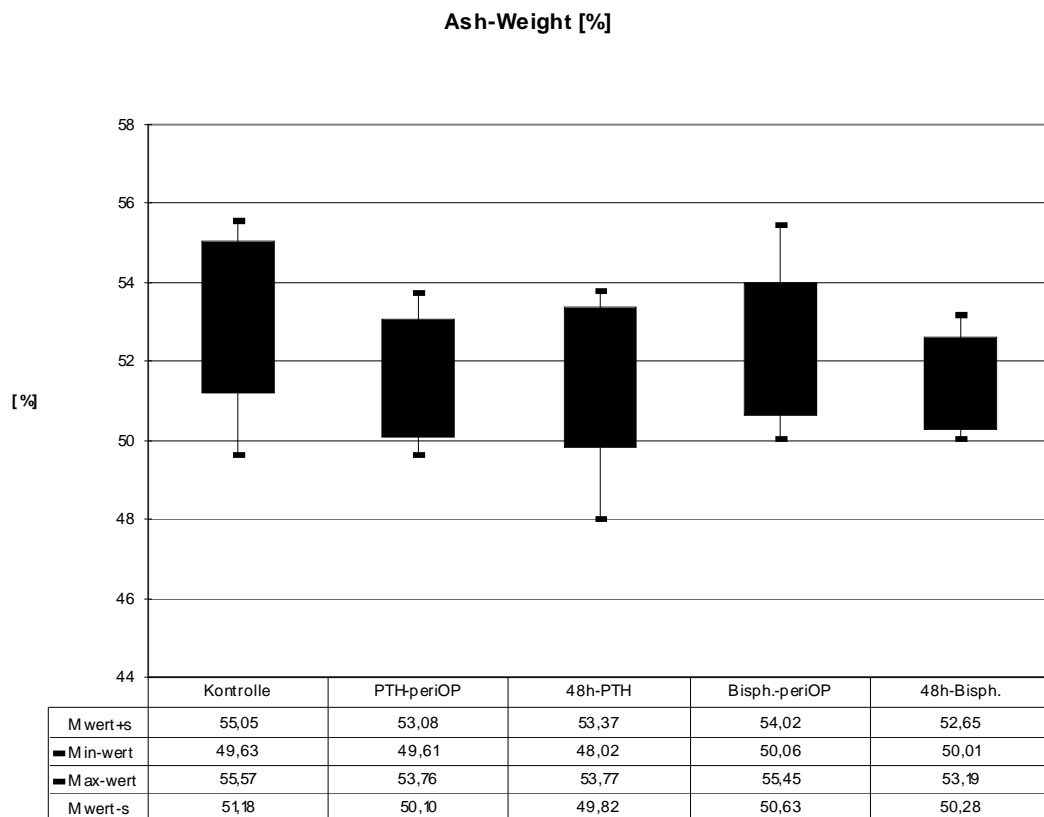


Abb. 27: Diagramm der Ash-weight-werte

Tabelle 10: Ergebnisse der Ash-weight-Bestimmung

Gruppe	Nummer	Gewicht Tibia [mg]	Ash weight[mg]	Ash weight [%]	Mittelwert [%]
Kontrolle	A1	-----			
Kontrolle	A2	321,6	159,6	49,62686567	
Kontrolle	A3	364,4	194,2	53,29308452	
Kontrolle	A4	302,9	163	53,81313965	
Kontrolle	A5	324,8	173,9	53,54064039	
Kontrolle	A6	337,3	183,2	54,31366736	53,113626
Kontrolle	A7	304,5	169,2	55,56650246	
Kontrolle	A8	383,8	198,2	51,64147994	
PTH peri.	B1	356,6	179,2	50,25238362	
PTH peri.	B2	374,2	193,7	51,76376269	
PTH peri.	B3	387,6	205	52,88957688	
PTH peri.	B4	329,8	177,3	53,75985446	51,593384
PTH peri.	B5	373,9	185,5	49,61219577	
PTH peri.	B6	353,4	180,5	51,07526882	
PTH peri.	B7	339,8	171,4	50,44143614	
PTH peri.	B8	360,7	191	52,95259218	
Bisph. Peri.	C1	365	190,5	52,19178082	
Bisph. Peri.	C2	410,7	205,6	50,06087168	
Bisph. Peri.	C3	372,7	193,9	52,02575798	
Bisph. Peri.	C4	-----	-----		
Bisph. Peri.	C5	348,8	193,4	55,44724771	52,322951
Bisph. Peri.	C6	324,4	169,2	52,15782984	
Bisph. Peri.	C7	368,5	188,5	51,15332429	
Bisph. Peri.	C8	328,8	175	53,22384428	
PTH 48h postop.	D1	325	172,1	52,95384615	
PTH 48h postop.	D2	367,6	190,9	51,93144723	
PTH 48h postop.	D3	351,7	183,5	52,17514927	
PTH 48h postop.	D4	360,7	173,2	48,01774328	
PTH 48h postop.	D5	363,9	190,9	52,45946689	
PTH 48h postop.	D6	360,7	182,5	50,59606321	51,595369
PTH 48h postop.	D7	346,5	186,3	53,76623377	
PTH 48h postop.	D8	370,8	188,6	50,86299892	
Bisph. 48h postop.	E1	370,4	191,7	51,75485961	
Bisph. 48h postop.	E2	393,1	196,6	50,01271941	
Bisph. 48h postop.	E3	310,2	161,2	51,96647324	
Bisph. 48h postop.	E4	294,8	156,8	53,18860244	51,463495
Bisph. 48h postop.	E5	324,6	165,9	51,1090573	
Bisph. 48h postop.	E6	329	164,7	50,06079027	
Bisph. 48h postop.	E7	383,9	195	50,79447773	
Bisph. 48h postop.	E8	327,9	173,2	52,82098201	

5. Diskussion

Die Lebensdauer eines orthopädischen Implantats hängt im wesentlichen ab von der Primärstabilität des Implantats innerhalb der ersten 6 Monate. Ergebnisse bisheriger tierexperimenteller Studien zeigen, dass die Primärstabilität sich unter intermittierender Parathormon- oder Bisphosphonattherapie verbessern kann.

Ziel dieser Studie war es, zu erforschen, wie sich das Einwachs- und Fixationsverhalten von Implantaten im Knochen unter *einmaliger* Gabe einer hormonalen Substitutionstherapie bzw. eines Bisphosphonat verhält. Da die sekundäre Knochenheilung der Ratte im wesentlichen genauso verläuft wie die des Menschen, wurden unsere Versuche an Ratten durchgeführt.

Es konnte in mechanischen Pull-out-Tests gezeigt werden, dass bei beiden Bisphosphonat-Versuchsgruppen-Pull-out-Tests die einmalige Gabe von Alendronat, entweder direkt während der Operation oder 48 Stunden danach eine um das 1,55-fache erhöhte Zugkraft zur Entfernung des Implantats im Verhältnis zur Kontrollgruppe benötigt wurde. Alendronat scheint sich also auch bei einmaliger Gabe positiv auf die Stabilität von Stahlschrauben-Implantaten auszuwirken. Ursächlich für den positiven mechanischen Effekt unter einmaliger Bisphosphonatgabe könnte der möglicherweise sehr früh einsetzende antiresorptive Effekt des Medikamentes und die dadurch verbesserte mechanische Stabilität des Knochens sein.

Im Gegensatz hierzu wies die Alendronat-Versuchsgruppe mit postoperativer Gabe bei der histomorphometrischen Analyse eine um das 2,4-fache geringere Knochen-Implantat-Kontaktfläche im Verhältnis zur Kontrollgruppe auf. Die Osseointegration der PMMA-Implantate verschlechtert sich also nach histomorphometrischen Kriterien unter einmaliger 48h-postoperativer Gabe von Alendronat. Die periprothetische Knochendichte zeigte demgegenüber keine signifikanten Veränderungen unter Alendronat-Therapie.

Unter einmaliger Parathormongabe ergaben sich in dieser Studie weder in der peri- noch in der postop-Gruppe bei histomorphometrischen und mechanischen Analysen signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe. Auch bei der Bestimmung des Körpergewichts und des Ash-weight gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppen.

5.1 Studien zum Einwachsverhalten von PMMA- und Stahlschrauben-Implantaten unter intermittierender PTH- oder Bisphosphonat-Gabe:

Grundlagen für diese Studie waren Untersuchungen über das Einwachsverhalten von PMMA-Implantaten und Stahlschrauben unter Parathormon-Therapie (6, 7, 80). Skripitz et al., 2001, zeigten, dass eine 4-wöchige Behandlung mit Parathormon ($60\mu\text{g/kg KG/d}$) zu einer verbesserten Integration von Stahlschrauben-Implantaten führt. Bei mechanischen Test wurde für die Torsionskraft in der Parathormon-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein 3,18-fach höherer Wert benötigt. Bei Pull-out-Versuchen betrug der Wert das 2,1-fache der Kontrollgruppe. Histologische Untersuchungen zeigten in der Parathormon-Gruppe periimplantär eine Reduktion des fibrösen Bindegewebes zugunsten von Knochenmatrix. Das Einwachsverhalten von Stahl- und PMMA-Zementstäben unter Parathormon-Gabe ($3 \times 60\mu\text{g/kg KG/woche}$) untersuchte Böhling 2004 an Ratten und verglich den direkten Implantat-Knochen-Kontakt von PMMA- und Stahlimplantat. Der Implantat-Knochen-Kontakt lag nach 2 Wochen bei den Stahlstäben 3-fach und bei den PMMA-Stäben 7-fach über dem Wert der Kontrollgruppe. Nach 4 Wochen besaß der Implantat-Knochen-Kontaktanteil bei beiden Implantattypen einen ca. 5-fach erhöhten Wert gegenüber der Kontrollgruppe. Böhling begründete den anfänglich verbesserten, direkten Kontakt zwischen PMMA-Stab und Knochen mit der höheren Oberflächen-roughness ($R_a = 2,06\mu\text{m}$) des PMMA-Zements, die den Knochenzellen eine bessere Grundlage zum Anbau darstellt. Die Oberflächen-roughness der Stahlstäbe betrug $R_a = 0,116\mu\text{m}$. In der Stahlimplantatgruppe besaß die periprothetische Knochendichte nach 4 Wochen einen 1,4-fachen Wert gegenüber der PMMA-Implantatgruppe und einen 4,1-fach höheren Wert gegenüber der Kontrollgruppe (6).

Werner, 2004, verglich das Integrationsverhalten von PMMA-Implantaten unter PTH- ($60\mu\text{g/kg KG}$) oder Bisphosphonat ($200\mu\text{g/kg KG}$) -Gabe an ovariectomierten Ratten. Der Implantat-Knochen-Kontaktanteil lag in der Parathormon-behandelten Gruppe mit 54% eineinhalbmal über dem Anteil in der Bisphosphonatgruppe (33,4%), zweieinhalbmal über dem der ovariectomierten Kontrollgruppe (19,9%) und dreimal über dem der nicht-ovariectomierten Kontrollgruppe (17,6%). In der Parathormon-behandelten Gruppe fand sich zudem ein signifikanter Zuwachs an Knochendichte BMD (Mittelwert:

190mg/cm²) gegenüber den beiden Kontrollgruppen (Mittelwerte: 163mg/cm² und 158mg/cm²). Diese positiven Ergebnisse gaben Anlass zu untersuchen, ob sich das Integrationsverhalten von Implantaten auch nach einmaliger Dosisgabe von Parathormon oder Bisphosphonat verbessern würde (7).

5.2 Der antiresorptive(katabole) Effekt von Bisphosphonaten

Der antiresorptive Effekt von Bisphosphonaten ist bereits in zahlreichen wissenschaftlichen und klinischen Studien belegt worden (43, 49, 81). Ihre antikatabole Wirkung kommt hauptsächlich über die Hemmung von Knochenabbau durch Osteoklasten zustande. Bisphosphonate wirken auf Osteoklasten über unterschiedliche Mechanismen. Sie mindern entweder direkt die Osteoklasten-Aktivierung (51, 82, 83) oder direkt und indirekt die Bereitstellung neuer Osteoklasten durch Osteoklastogenese (52, 84). Ein weiterer Wirkmechanismus des Medikamentes ist das Verkürzen der Osteoklasten- und Makrophagenlebensdauer durch Apoptoseinduktion (56). Neuere Studien von Im GI haben gezeigt, dass Bisphosphonate auch fördernd auf Proliferation und Reifung von Osteoblasten wirken können und so auch anabole Eigenschaften besitzen (85).

Die klinische Anwendung von Bisphosphonaten ist in der heutigen Medizin weit verbreitet. Besonders in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose werden sie bisher bevorzugt eingesetzt (7, 86, 87). Aber auch in anderen Disziplinen nutzt man die antiresorptiven Eigenschaften der Bisphosphonate. Palliativ setzt man Bisphosphonate ein in der Therapie der malignen Hyperkalzämie bei Knochenmetastasen, z.B. beim multiplen Myelom, Mamma- oder Prostatakarzinom (46, 81, 88-90). Weitere Anwendungsindikationen sind Morbus Paget (91), juvenile Knochenerkrankungen wie Osteogenesis Imperfecta, Morbus Gaucher oder das McCune-Albright-Syndrom (92) und die CIN (chronische idiopathische Neutropenie) -assoziierte Osteopenie (93). Ein voraussichtlich weiteres Anwendungsgebiet für Bisphosphonate liegt in der Prophylaxe von Implantatlockerungen nach chirurgischen oder orthopädischen Operationen (4).

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass sich, unabhängig vom Zeitpunkt, während oder 48h nach der Operation, unter Alendronat-Gabe die Primärstabilität von Stahlschrauben-Implantaten verbesserte. Bezogen auf die Kontrollgruppe (Mittelwert: 45,6 N) wurde in einem Pull-out-Versuch eine 1,55-

fach (Mittelwerte: 70,5 N und 70,8 N) höhere Zugkraft benötigt. Dieses Ergebnis geht konform mit denen vorangegangener Studien, die die Wirkung von Bisphosphonaten in verschiedenen Zusammenhängen prüften (48, 94, 95).

Wir nehmen an, Gründe für die erhöhte Stabilität könnten sein:

Alendronat werden proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (60). Aufgrund der Stimulation einer Entzündungsreaktion durch Alendronat wird der periimplantäre Heilungsprozess beschleunigt, wodurch unmittelbar um das Stahlschraubengewinde weniger Knochenumbau stattfinden würde. Dies würde dem Implantat mittels dichterem Gewebe in den Gewindetiefen der Schraube zu erhöhter primärer Stabilität verhelfen.

Auch die reduzierte Knochen-Implantat-Fläche durch Gabe von Alendronat 48 Stunden nach der Operation lässt sich durch den proinflammatorischen Effekt erklären. Entzündungsbedingt wird in den ersten Tagen periimplantär vermehrt Granulations- und fibrovaskuläres Gewebe durch Fibroblasten gebildet, das dann normalerweise in der reparativen Phase von Makrophagen wieder abgebaut wird. Mittels der Reduktion der Makrophagenanzahl durch Alendronat, das in diesem Falle 48 Stunden nach der Implanatation verabreicht wurde, kommt es aber zu einem geringeren Abbau von fibrovaskulärem Gewebe zwischen Implantat und Knochen, so dass sich nach histomorphometrischen Kriterien zwar der Knochen-Implantat-Kontakt verringert, eine mechanische Stabilität aber gewährleistet wird. Diese Vermutung zur Zunahme der Stabilität bei systemischer Alendronat-Gabe äußerten schon Miyaji et al. bei ihren Versuchen. Sie behandelten über 5 Wochen Ratten, denen über einen externen Fixateur eine Kortikalisschraube implantiert wurde, mit einer wöchentlichen Alendronat-Dosis von 350µg/kg KG. Die Ergebnisse zeigen, dass sich unter Alendronat-Therapie radiographisch weniger osteolytische Areale ausbildeten. Zugleich waren in der Alendronat-Gruppe weniger TRAP-positive mononukleäre Zellen, die als Marker für Osteoklasten gelten, zu finden (95). Tengvall et al. präsentierten Ergebnisse, nach denen sich bei mit dem Bisphosphonat Pamidromat-beschichteten Stahlschrauben nach zwei Wochen die primäre mechanische Fixation signifikant verbessert (94). Gegenüber unbeschichteten Stahlschrauben wurde eine um 28% erhöhte Pull-out-Zugkraft benötigt, und die Pull-out-Energie stieg um 90%. Auch andere Studien zeigten eine signifikante Zunahme an periimplantärer Knochensubstanz bei

Bisphosphonat-beschichteten Ca-Ti-Implantaten verglichen mit unbeschichteten Ca-Ti-Implantaten (96).

Nach Annahme von Aspenberg und Van der Vis steht das Maß an primär freier Beweglichkeit eines Implantats in direktem Verhältnis zu der späteren Implantatlockerung. Aufgrund der minimalen Instabilität periimplantär kommt es zur Knochenresorption durch Osteoklasten (1, 65). Astrand et Aspenberg, 2002, testeten über sechs Wochen mittels einer beweglichen Druckplatte, die durch Drehung Druck auf den Knochen ausüben kann, wie sich Knochen unter Bisphosphonat-Therapie verhält. Die Druckplatte imitierte die Implantatbewegungen. Ab der fünften Woche wurden die beweglichen Implantatteile jeweils an fünf Tagen pro Woche um 180° gedreht. Eine Woche nach der Operation erhielten die Versuchstiere dreimal wöchentlich Bisphosphonatdosen von entweder 3,8µg/kg KG, von 21µg/kg KG oder von 205µg/kg KG. In allen mit Bisphosphonat behandelten Gruppen fand man im Verhältnis zur Kontrollgruppe einen erhöhten Knochen-Mineralgehalt, jedoch fand sich nur in der mit 205µg/kg KG Bisphosphonat behandelten Gruppe eine verringerte Knochenresorption des Implantats. Trotz Drehung (Instabilität) war der Implantat-Knochen-Kontakt bei einigen Versuchstieren komplett intakt, wohingegen bei den nicht mit Bisphosphonaten behandelten Gruppen die Implantate größtenteils von einer fibrösen Bindegewebschicht umgeben waren (97). Hilding et al. erwiesen bei radiostereometrischen Analysen (RSA) von Prothesenmigration bei totalen Knie-Endoprothesen, dass sich unter oraler Bisphosphonat-Therapie die Implantatwanderung (0,29mm), verglichen mit der Kontrollgruppe (0,4mm), signifikant reduzierte (4). Eine weitere Ursache von Implantatlockerung, die diskutiert wird, ist ein erhöhter Flüssigkeitsdruck in Gelenkhöhle und Knochen-Implantat-Zwischenraum (64-66).

Astrand et al. untersuchten auch den Effekt von Bisphosphonaten auf nekrotischen Knochen. Die Resorption nekrotischen Knochens verläuft unter Bisphosphonat-Therapie solange reduziert, bis durch Bildung neuen Knochens die Stabilität des Knochens gewährleistet ist (97). Durch die Implantation entstehende Wund- und Nekroseherde werden so langsamer resorbiert, und dies könnte sich positiv auf die Primärstabilität auswirken. Dass die Knochenresorption nicht nur bei systemischer, sondern auch unter topischer Gabe von Bisphosphonaten reduziert wird, haben Yaffe et al., 1997 und Astrand et al., 2000 in ihren Studien bewiesen

(48, 98). Bei einer plastischen Schleimhaut-Periost-Lappen-Operation an Rattenmandibulae tränkte Yaffe einen Schwamm mit einer Bisphosphonat-Lösung und beließ diesen für zwei Stunden in situ auf der alveolären Knochenoberfläche. Die topische Alendronat-Gabe reduzierte die Abnahme an Knochenmasse um 52% gegenüber der mit Kochsalz behandelten kontralateralen Mandibulaseite (48). In einem weiteren Versuch mit der bereits oben genannten Knochendruckkammer, applizierten Astrand et al. zwischen Druckkammer und Knochen für 1 Minute eine Alendronat-Lösung (20mg/ml) und säuberten dieses Areal anschließend mit NaCl-Lösung und Schwamm, bevor für fünf Tage Druck auf den Knochen ausgeübt wurde. In der Alendronat-behandelten Gruppe fand sich in histomorphometrischen Analysen eine signifikante ($p=0,004$) Reduktion der Knochenresorption im Verhältnis zu Kontrollgruppe (98).

Da sich nach einmaliger Alendronat-Gabe von $205\mu\text{g/kg KG}$, entweder peri- oder 48h postoperativ, keine signifikanten Unterschiede in den histomorphometrischen Untersuchungen zeigten, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie annehmen dass Alendronat, einmalig subkutan gegeben, die Knochendichte nicht beeinflusst. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass, wie es auch Astrand 2002 beschreibt, die Resorption im Falle von Instabilitäts-verursachter Knochenresorption, verglichen mit normalem Remodeling, verstärkt abläuft (97). Dies kommt zustande durch entweder erhöhte Resorptionsaktivität jedes einzelnen Osteoklasten oder vermehrtes Recruitment von Osteoklasten. Vorausgesetzt, dass aufgenommenes Alendronat die Zellfunktion verschlechtert, ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelner Osteoklast durch verstärkten Stimulus vermehrt Knochen resorbieren kann bevor er inaktiviert wird. Wahrscheinlicher ist, dass jeweils eine bestimmte Menge an Knochen resorbiert werden kann, bis es zur Inaktivierung kommt. Wenn also, aufgrund von Instabilität, vermehrt Osteoklasten rekrutiert bzw. aktiviert werden und jeder einzelne Osteoklast für einige Zeit Knochen resorbiert bevor er durch Alendronat inaktiviert wird, würde trotz effektiver Alendronat-Wirkung ein anfänglicher Knochenverlust resultieren. Und da weitere Alendronat-bedingte, inhibitorische Stimuli fehlen, erfolgt auch weiterhin Knochenabbau. Ebenfalls könnte es sein, dass die von uns applizierte Alendronat-Dosis nicht ausreichend war, um die durch Instabilität erhöhte Anzahl an Osteoklasten vollständig zu inaktivieren, wohingegen sich bei intermittierender

Gabe dieser inhibierende Effekt wahrscheinlich über die Zeit aufsummiert und der Knochenabbau sistiert.

Ein weiterer Grund für die histomorphometrischen Ergebnisse könnte sein, dass nach vollständiger Aufnahme des Alendronat durch Osteoklasten, infolge des verstärkten Stimulus weiterhin Osteoklasten aktiviert wurden und die Knochenresorption wieder zunahm. Van der Vis, 1999 erklärte, dass aufgrund von erhöhtem Flüssigkeitsdruck, der periimplantär nach einer Implantation entsteht, sich der Osteolyse-aktivierende Effekt verstärkt (99). Es wäre möglich, dass, durch erhöhten Flüssigkeitsdruck bedingt, eine größere Anzahl an Osteoklasten aktiviert wurde als Alendronat, einmalig in dieser Dosis gegeben, zu inaktivieren fähig ist. Es resultiert auch hier ein Verlust an Knochenmasse. Eine Steigerung der Dosis oder häufigere Gabe sind wahrscheinlich nötig, um den Knochenverlust reduzieren zu können. Die Ergebnisse der mechanischen Tests zeigen uns, dass sich unter einmaliger Behandlung mit Bisphosphonat, trotz fehlendem histologischem und histomorphometrischem Nachweis, die mechanischen Eigenschaften von periprothetischem Gewebe verbessern lassen. Diese Vermutung gilt es in weiteren Studien zu untersuchen.

5.3 Anabole Eigenschaften von Parathormon

Dass Parathormon in intermittierender Dosierung anabole Eigenschaften besitzt, wurde schon früh vermutet (26). In den letzten Jahrzehnten befassten sich verschiedene Forschungsgruppen vermehrt mit dieser Eigenschaft. Besonders im Interesse der medizinischen Grundlagenforschung waren Untersuchungen, sich diese anabolen Eigenschaften zur Osteoporose-Therapie (100, 101) und zur Optimierung und Beschleunigung der Frakturheilung zu Nutzen machen zu können (29, 30, 102).

Andreassen et al. beispielsweise bewiesen 1999, dass intermittierende PTH(1-34)human-Gabe die Knochendichte und Kallusbildung von frakturiertem Knochen bei Ratten verstärkt und so die Frakturheilung beschleunigt. Der anabole Effekt trat nach Applikation höherer Dosen auf (200µg/kg KG/d über 20-40 Tage), wohingegen bei niedrigeren Dosen lediglich ein erhöhter Mineralgehalt zu messen war. In den nicht frakturierten, kontralateralen Tibiae stieg der Mineralgehalt

ebenfalls an, jedoch in sehr viel geringerem Maße als in den regenerierenden Knochen (29). Bei Versuchen derselben Autoren 2001 zeigte sich, dass Parathormon (200µg/kg KG/d über 3 oder 8 Wochen) auch an bereits ausgeheilten Tibiafrakturen zu einer Zunahme der Kallusbildung, der Knochenfestigkeit und des Kallusmineralgehalts führt. Nach drei Wochen stieg der Knochenmineralgehalt (BMC) unter Parathormon-Gabe auf 190% und nach acht Wochen auf 388% an. Der BMC nahm von Woche 3 bis 8 in der Kontrollgruppe um 60%, in der mit Parathormon behandelten Gruppe indessen um 169% zu. In den intakten, kontralateralen Tibiae dagegen stieg der BMC nur um 18% und 21% (nach 3 und 8 Wochen) an. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine Behandlung mit Parathormon die Frakturheilung positiv beeinflussen könnte, besonders im Falle reduzierter Kallusbildung (29, 103, 104).

Neben unterschiedlicher Wirkung auf frakturierten gegenüber intaktem Knochen, zeigt Parathormon zudem regionale Unterschiede. Untersuchungen von Skripitz et al. zeigten 2000 mittels einer Bone Conduction Chamber (BCC), dass sich der anabole Parathormon -Effekt mit um 73% erhöhter Knochendichte sehr viel stärker auf regenerierenden Knochen in der BCC auswirkt, als auf die Knochendichte der Referenzknochen. Im Lendenwirbelkörper lag der Parathormon-Effekt bei nur 56%, im Femur bei lediglich 14%. Es scheint, als wirke Parathormon unterschiedlich stark auf Knochensubstanz abhängig, von ihrer strukturellen Eigenschaft (105). Böhling verglich 2004 den anabolen Effekt von Parathormon auf regenerierenden und intakten Knochen an Ratten, denen zuvor Stahlschrauben implantiert wurden. Die Studie ergab, dass Parathormon die Knochendichte nach zwei Wochen auf den 1,5-fachen, und nach vier Wochen auf den 4-fachen Wert der Kontrollgruppe ansteigen liess, während die Zunahme der Knochendichte in den intakten Femura nach zwei Wochen das 2-fache betrug und nach 4 Wochen wieder auf das 1,5-fache des Wertes der Kontrollgruppe sank (6). Bei intermittierender Gabe scheint der Parathormon-Effekt also sehr viel stärker auf regenerierenden Knochen zu wirken und abhängig von der Knochenstruktur zu sein, wohingegen bei intaktem Knochen der anabole Effekt mit zunehmender Dauer nachlässt.

Lida-Klein et al. präsentierten 2001 Ergebnisse ihrer Studie, wonach die Zunahme der Knochendichte bei Ratten in den langen Knochen, wie Tibia und Femur, schneller erfolgt als in den lumbalen Wirbelkörpern. Die Zunahme der

Knochendichte in den Lendenwirbelkörpern war sehr viel geringer ausgeprägt und erst nach einer 7-wöchigen Behandlung signifikant (106). Ursachen, weshalb Parathormon gegenüber verschiedenen Skelettstrukturen unterschiedlich bzw. skelettspezifisch wirkt, sind bisher unklar. Möglicherweise wirkt Parathormon primär auf Skelettstrukturen, die erhöhtem mechanischem Stress und Gewichtbelastungen ausgesetzt sind (106). Halloran et al., 1997 erkannten einen belastungsabhängigen Parathormon-Effekt: Parathormon kann bei fehlender Belastung die entstehende Osteopenie zwar nicht reduzieren, die Ansprechbarkeit von kortikalem Knochen auf Parathormon aber erhöhen. Bei anschließender Wiederbelastung erhöht sich dadurch auch die Knochenmasse, was man als prophylaktischen Schutz von nichtbelastetem Knochen nutzen könnte (107). Diesen synergistisch anabolen Effekt von Parathormon und mechanischer Belastung bestätigen auch Studien von Ma und Li J. et al. (108, 109).

Die Zunahme der Knochendichte unter intermittierender Parathormon-Gabe ist in spongiosen Knochen sehr viel ausgeprägter als im Knochen-Kortex-Bereich (10, 104, 110, 111). Da jedoch sowohl Femur und Tibia als auch Wirbelkörper reich an spongiosen Knochen sind, erklärt dies nicht die regionale unterschiedliche Wirkung. Vermutungen, dass der Parathormon-Effekt abhängig davon sein könnte, dass ein Knochen gelbes oder rotes Knochenmark besitzt, ließen sich jedoch widerlegen (112).

Eine einmalige systemische Applikation von PTH(1-34) in der Dosis von 60 µg/kg KG, entweder perioperativ oder 48 Stunden nach der Operation, verbessert die Osseointegration von Stahl- und PMMA-Zement-Implantaten nicht. Gründe hierfür könnten sein, dass durch nur einmalige Gabe von Parathormon, der proliferationsstimulierende Effekt von erhöhter IGF-1-Konzentration auf Osteoblasten, der bei intermittierender Gabe auftritt (36, 37), ausbleibt bzw. die Konzentration von IGF-1 nur gering ansteigt oder aber schnell wieder auf den Ursprungslevel absinkt und so kein anaboler Effekt resultieren kann.

Da es sich bei Osteoblasten um kurzlebige Zellen (ca. 200 Std.) handelt und auch der zellbeeinflussende Effekt von Parathormon von nur kurzzeitiger Dauer ist, nehmen Jilka et al. an, dass eine Zunahme an Knochenmasse wahrscheinlich als kumulatives Resultat, von sich täglich wiederholender Verzögerung des Eintritts von Osteoblasten in die Apoptose durch Parathormon, und dies über mehrere

Osteoblastengenerationen, entsteht (35, 113). Eine einmalige Gabe von Parathormon führt somit zu keiner messbaren Zunahme an Knochenmasse.

Wir nehmen an, dass bei nur einmaliger Parathormon-Gabe die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten-Progenitor-Zellen zu Osteoblasten, die bei intermittierender Parathormon-Gabe verstärkt stattfinden (32), ausbleiben oder in zu geringer Anzahl stattfinden, bzw. nur eine Osteoblasten-Progenitor-Zellgeneration betreffen und es deshalb zu keinem anabolen Effekt kommt.

Dobnig und Turner zeigten, dass der anabole Effekt intermittierender Parathormon-Gabe über eine Zunahme der Osteoblastenpopulation durch Differenzierung von Bone-lining-cells zu Osteoblasten zustande kommt (10). Dass eine einmalige Stimulation von Bone lining cells durch Parathormon zur Differenzierung nicht ausreicht oder nur wenige Zellen betrifft, könnte ein weiterer Grund sein, der für das Ausbleiben des anabolen Parathormon-Effekts spricht (10).

Der genaue Wirkmechanismus des anabolen Effekts von Parathormon auf Osteoblasten ist bisher nicht vollständig geklärt und entsteht wohl als Ergebnis verschiedener einzelner „Zell-beeinflussender Effekte“, die sich über einen längeren Zeitraum aufsummieren und mehrere Osteoblastengenerationen betreffen müssen, um einen messbaren Effekt auslösen zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zur verbesserten Osseointegration von Stahl- und PMMA-Zement-Implantaten, eine intermittierende Gabe von Parathormon benötigt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden die Möglichkeiten einer Verbesserung der Osseointegration von PMMA- und Stahlimplantaten durch einmalige, entweder peri- oder 48 Stunden postoperative Behandlung mit PTH(1-34) in einer Dosis von $60\mu\text{g/kg}$ KG oder Alendronat in einer Dosis von $205\mu\text{g/kg}$ KG, histomorphometrisch und mechanisch an männlichen Wistar-Ratten untersucht. Dafür wurde Versuchstieren je ein PMMA-Zementstab und eine Schraube pro Tibia implantiert. Die 40 Tiere wurden in fünf Gruppen unterteilt, von denen eine Gruppe als Kontrollgruppe fungierte und perioperativ eine Placeboinjektion erhielt. Nach 2 Wochen wurden die Tibiae entnommen und diejenigen mit PMMA-Implantat histomorphometrisch ausgewertet. An den Tibiae mit Stahlimplantaten wurden mechanische Tests durchgeführt und darauf folgend das Ash-weight der proximalen Tibiassegmente bestimmt.

Die Ergebnisse der mechanischen Tests zeigten in beiden Bisphosphonat-Gruppen einen um das 1,55-fache erhöhten Wert der benötigten Zugkraft im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Ursache dieser verbesserten Stabilität könnte in den proinflammatorischen Eigenschaften, die Alendronat zugeschrieben werden, liegen. Wir nehmen an, dass es, durch Alendronat bedingt, zu einem Zuwachs an periimplantärem, fibrovaskulärem Gewebe und daher zu verstärkter primärer Stabilität der Schraubengewinde im Knochen kommt. Unter PTH-Einfluss zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den mechanischen Tests. Wie andere Studien zeigen konnten, benötigt es zur Verbesserung der Osseointegration von PMMA-Zement- und Stahlimplantaten die mehrfache Gabe von PTH über einen längeren Zeitraum. Bezüglich des Ash-weight zeigten die Versuchsgruppen keine Signifikanz; weder gegenüber der Kontrollgruppe, noch untereinander.

Die histomorphometrischen Analysen ergaben in der Versuchsgruppe, die Alendronat 48 Stunden postoperativ erhielt, eine um das 2,4-fach geringere Knochen-Implantat-Kontaktfläche. Ursächlich könnten auch hier die proinflammatorischen Eigenschaften sein, die in die zu diesem Zeitpunkt bereits ablaufenden Entzündungsvorgänge eingreifen.

Alendronat führt neben einem Zuwachs an fibrovaskulärem Gewebe auch zu einer Minderung der, dieses fibrovaskuläre Gewebe wieder abbauenden, Makrophagenanzahl, was in einer Reduktion des Knochen-Implantat-Kontakts bei

erhöhter mechanischer Stabilität der Implantate resultiert. Die anderen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen. Auch bei der Bestimmung der periprothetischen Knochendichte mittels Merz-Grid wiesen die Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich weder PTH noch Alendronat nach einmaliger Gabe in diesen Dosierungen wirklich positiv auf die histologische Implantatintegration und Knochendichte auswirken. Es scheint jedoch, dass Alendronat, peri- und postoperativ gegeben, zu einer verbesserten Primärstabilität von Schraubenschrauben-Implantaten beitragen kann. Diese Erkenntnis und die Ursachen, die zu einer Minderung des Knochen-Implantat-Kontaktes nach Alendronat-Gabe führen, gilt es in weiteren Studien zu erforschen.

7. Literatur

1. Ryd L, Albrektsson BE, Carlsson L, Dansgard F, Herberts P, Lindstrand A, et al. Roentgen stereophotogrammetric analysis as a predictor of mechanical loosening of knee prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 1995;77(3):377-83.
2. Aspenberg P, Van der Vis H. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1998(352):75-80.
3. Soderman P. On the validity of the results from the Swedish National Total Hip Arthroplasty register. *Acta Orthop Scand Suppl* 2000;71(296):1-33.
4. Hilding M, Ryd L, Toksvig-Larsen S, Aspenberg P. Clodronate prevents prosthetic migration: a randomized radiostereometric study of 50 total knee patients. *Acta Orthop Scand* 2000;71(6):553-7.
5. Skripitz R, Aspenberg P. Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. *Clin Orthop Relat Res* 2001(392):427-32.
6. Böhling S. Verbesserung der Implantat-Integration durch Parathormon. PMMA und Edelstahl im histomorphometrischen Vergleich [Med. Dissertation]. Hamburg: Universität Hamburg; 2004.
7. Werner A. Verbesserung des Intergrationsverhaltens von PMMA-Zement durch osteogenetische Faktoren bei Osteoporose [Med. Dissertation]. Hamburg: Universität Hamburg; 2004.
8. Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, et al. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 2003;90(1):158-69.
9. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998;102(2):274-82.
10. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995;136(8):3632-8.
11. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183(1):1-44.
12. Teti A, Marchisio PC, Zallone AZ. Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am J Physiol* 1991;261(1 Pt 1):C1-7.
13. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21(2):115-37.
14. Weir EC, Lowik CW, Paliwal I, Insogna KL. Colony stimulating factor-1 plays a role in osteoclast formation and function in bone resorption induced by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 1996;11(10):1474-81.

15. Suda N, Baba O, Udagawa N, Terashima T, Kitahara Y, Takano Y, et al. Parathyroid hormone-related protein is required for normal intramembranous bone development. *J Bone Miner Res* 2001;16(12):2182-91.
16. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3597-602.
17. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle W-J, Lacey D-L, Riggs B-L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal-of-clinical-investigation,-The* 2003;111(8):1221-30.
18. Lüllmann-Rauch. *Histologie*. 2003: 1.Auflage;132.
19. Rodan GA. Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:55-61.
20. Mentaverri R, Kamel S, Brazier M. Involvement of capacitive calcium entry and calcium store refilling in osteoclastic survival and bone resorption process. *Cell Calcium* 2003;34(2):169-75.
21. Löffler G. *PPE. Pathobiochemie der extrazellulären Matrix. Biochemie und Pathobiochemie* 1998;6. Auflage:861.
22. Habener JF, Stevens TD, Ravazzola M, Orci L, Potts JT, Jr. Effects of calcium ionophores on the synthesis and release of parathyroid hormone. *Endocrinology* 1977;101(5):1524-37.
23. Potts JT, Jr., Kronenberg HM, Rosenblatt M. Parathyroid hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv Protein Chem* 1982;35:323-96.
24. Potts JT, Jr. Hyperparathyroidism and other hypercalcemic disorders. *Adv Intern Med* 1996;41:165-212.
25. Luben RA, Goggins JF, Raisz LG. Stimulation by parathyroid hormone of bone hyaluronate synthesis in organ culture. *Endocrinology* 1974;94(3):737-45.
26. Selye H. On the Stimulation of new Bone-Formation with Parathyroid Extract and Irradiated Ergosterol. *Endocrinology* 1932;16:547-558.
27. Gunness-Hey M, Hock JM. Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984;5(4):177-81.
28. Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H, Jorgensen PH, Bak B, Haggblad J, et al. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. *J Bone Miner Res* 1993;8(9):1097-101.
29. Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res* 1999;14(6):960-8.
30. Holzer G, Majeska RJ, Lundy MW, Hartke JR, Einhorn TA. Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 1999(366):258-63.
31. Kim HW, Jahng JS. Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Iowa Orthop J* 1999;19:71-7.

32. Nishida S, Yamaguchi A, Tanizawa T, Endo N, Mashiba T, Uchiyama Y, et al. Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone* 1994;15(6):717-23.
33. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 2002;17(11):2038-47.
34. Qi H, Li M, Wronski TJ. 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* 1995;10(6):948-55.
35. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999;104(4):439-46.
36. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 1989;83(1):60-5.
37. Watson PH, Fraher LJ, Kisiel M, DeSousa D, Hendy G, Hodzman AB. Enhanced osteoblast development after continuous infusion of hPTH(1-84) in the rat. *Bone* 1999;24(2):89-94.
38. Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. 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* 1995;17(5):479-84.
39. Bertolini DR, Votta B, Hoffman S, Strassmann G. 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* 1994;6(4):368-75.
40. Holt I, Davie MW, Braidman IP, Marshall MJ. Interleukin-6 does not mediate the stimulation by prostaglandin E2, parathyroid hormone, or 1,25 dihydroxyvitamin D3 of osteoclast differentiation and bone resorption in neonatal mouse parietal bones. *Calcif Tissue Int* 1994;55(2):114-9.
41. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001;142(9):4047-54.
42. Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S, et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997;99(12):2961-70.
43. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19(1):80-100.
44. Liebermann U, Weiss SR, Broll J. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;333:1437-1443.
45. Siris E, Weinstein RS, Altman R, Conte JM, Favus M, Lombardi A, et al. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(3):961-7.

46. Nussbaum SR, Warrell RP, Jr., Rude R, Glusman J, Bilezikian JP, Stewart AF, et al. Dose-response study of alendronate sodium for the treatment of cancer-associated hypercalcemia. *J Clin Oncol* 1993;11(8):1618-23.
47. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991;42(6):919-44.
48. Yaffe A, Iztokovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 1997;68(9):884-9.
49. Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:375-88.
50. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88(6):2095-105.
51. Russell RG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res* 1999;14 Suppl 2:53-65.
52. Schmidt A, Rutledge SJ, Endo N, Opas EE, Tanaka H, Wesolowski G, et al. Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(7):3068-73.
53. van Beek ER, Lowik CW, Papapoulos SE. Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice. *Bone* 1997;20(4):335-40.
54. Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* 2001;232:235-47; discussion 247-50.
55. Owens JM, Fuller K, Chambers TJ. Osteoclast activation: potent inhibition by the bisphosphonate alendronate through a nonresorptive mechanism. *J Cell Physiol* 1997;172(1):79-86.
56. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10(10):1478-87.
57. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2004;75(6):451-61.
58. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286(5446):1946-9.
59. Opas EE, Rutledge SJ, Golub E, Stern A, Zimolo Z, Rodan GA, et al. Alendronate inhibition of protein-tyrosine-phosphatase-meg1. *Biochem Pharmacol* 1997;54(6):721-7.
60. Makkonen N, Hirvonen MR, Teravainen T, Savolainen K, Monkkonen J. Different effects of three bisphosphonates on nitric oxide production by RAW 264 macrophage-like cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277(2):1097-102.
61. Herberts P, Malchau H. How outcome studies have changed total hip arthroplasty practices in Sweden. *Clin Orthop Relat Res* 1997(344):44-60.

62. Howie DW, Vernon-Roberts B, Oakeshott R, Manthey B. A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70(2):257-63.
63. Goodman SB, Lind M, Song Y, Smith RL. In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clin Orthop Relat Res* 1998(352):25-34.
64. Robertsson O, Wingstrand H, Kesteris U, Jonsson K, Onnerfalt R. Intracapsular pressure and loosening of hip prostheses. Preoperative measurements in 18 hips. *Acta Orthop Scand* 1997;68(3):231-4.
65. Van der Vis HM, Aspenberg P, Marti RK, Tigchelaar W, Van Noorden CJ. Fluid pressure causes bone resorption in a rabbit model of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res* 1998(350):201-8.
66. Van der Vis H, Aspenberg P, de Kleine R, Tigchelaar W, van Noorden CJ. Short periods of oscillating fluid pressure directed at a titanium-bone interface in rabbits lead to bone lysis. *Acta Orthop Scand* 1998;69(1):5-10.
67. Skripitz R, Aspenberg P. Tensile bond between bone and titanium: a reappraisal of osseointegration. *Acta Orthop Scand* 1998;69(3):315-9.
68. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, de Groot K. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. *J Biomed Mater Res* 1994;28(1):7-15.
69. Kitsugi T, Nakamura T, Oka M, Yan WQ, Goto T, Shibuya T, et al. Bone bonding behavior of titanium and its alloys when coated with titanium oxide (TiO₂) and titanium silicate (Ti₅Si₃). *J Biomed Mater Res* 1996;32(2):149-56.
70. Espehaug B, Furnes O, Havelin LI, Engesaeter LB, Vollset SE. The type of cement and failure of total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84(6):832-8.
71. Roy N, Hossain S, Ayeko C, McGee HM, Elsworth CF, Jacobs LG. 3M Capital hip arthroplasty: 3-8-year follow-up of 208 primary hip replacements. *Acta Orthop Scand* 2002;73(4):400-2.
72. Parvizi J, Hanssen AD, Spangehl MJ. Total knee arthroplasty following proximal tibial osteotomy: risk factors for failure. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(3):474-9.
73. Ong A, Wong KL, Lai M, Garino JP, Steinberg ME. Early failure of precoated femoral components in primary total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(5):786-92.
74. Kienapfel H, Sumner DR, Turner TM, Urban RM, Galante JO. Efficacy of autograft and freeze-dried allograft to enhance fixation of porous coated implants in the presence of interface gaps. *J Orthop Res* 1992;10(3):423-33.
75. Wang BC, Lee TM, Chang E, Yang CY. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone: the effect of coating thickness. *J Biomed Mater Res* 1993;27(10):1315-27.
76. Teti A, Tarquilio A, Grano M, Colucci S, Laforgia A, Mangini F, et al. Effects of calcium-phosphate-based materials on proliferation and alkaline phosphatase activity of newborn rat periosteal cells in vitro. *J Dent Res* 1991;70(6):997-1001.

77. Sumner DR, Turner TM, Purchio AF, Gombotz WR, Urban RM, Galante JO. Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(8):1135-47.
78. Cook SD, Rueger DC. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 1996(324):29-38.
79. Lind M, Overgaard S, Nguyen T, Ongpipattanakul B, Bunger C, Soballe K. Transforming growth factor-beta stimulates bone ongrowth. Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs. *Acta Orthop Scand* 1996;67(6):611-6.
80. Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. A dose-response study. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82(1):138-41.
81. Fleisch H. The bisphosphonate ibandronate, given daily as well as discontinuously, decreases bone resorption and increases calcium retention as assessed by ⁴⁵Ca kinetics in the intact rat. *Osteoporos Int* 1996;6(2):166-70.
82. Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporos Int* 1999;9 Suppl 2:S66-80.
83. Rodan GA, Reszka AA. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr Mol Med* 2002;2(6):571-7.
84. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996;137(6):2324-33.
85. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25(18):4105-15.
86. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 1996;348(9041):1535-41.
87. Bone HG, Greenspan SL, McKeever C, Bell N, Davidson M, Downs RW, et al. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. Alendronate/Estrogen Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(2):720-6.
88. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289(5484):1508-14.
89. Riccardi A, Grasso D, Danova M. Bisphosphonates in oncology: physiopathologic bases and clinical activity. *Tumori* 2003;89(3):223-36.
90. Lipton A. Bisphosphonates and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2003;97(3 Suppl):848-53.
91. Rutland M, Wattie D, Que L, Hassan IM, Cundy T. Bisphosphonate space measurement and dosage requirement for intravenous clodronate treatment of Paget's disease. *Calcif Tissue Int* 2002;70(2):99-102.
92. Allgrove J. Use of bisphosphonates in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15 Suppl 3:921-8.
93. Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, Malliaraki N, Psyllaki M, Pontikoglou C, et al. Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and

- improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2004;22(6):577-87.
94. Tengvall P, Skoglund B, Askendal A, Aspenberg P. Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. *Biomaterials* 2004;25(11):2133-8.
95. Miyaji T, Nakase T, Azuma Y, Shimizu N, Uchiyama Y, Yoshikawa H. Alendronate inhibits bone resorption at the bone-screw interface. *Clin Orthop Relat Res* 2005(430):195-201.
96. Kajiwara H, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Iyama S, Atsuta I, et al. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials* 2005;26(6):581-7.
97. Astrand J, Aspenberg P. Reduction of instability-induced bone resorption using bisphosphonates: high doses are needed in rats. *Acta Orthop Scand* 2002;73(1):24-30.
98. Astrand J, Skripitz R, Skoglund B, Aspenberg P. A rat model for testing pharmacologic treatments of pressure-related bone loss. *Clin Orthop Relat Res* 2003(409):296-305.
99. Van der Vis HM, Aspenberg P, Tigchelaar W, Van Noorden CJ. Mechanical compression of a fibrous membrane surrounding bone causes bone resorption. *Acta Histochem* 1999;101(2):203-12.
100. Lindsay R, Nieves J, Formica C, Henneman E, Woelfert L, Shen V, et al. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet* 1997;350(9077):550-5.
101. Fujita T, Inoue T, Morii H, Morita R, Norimatsu H, Orimo H, et al. Effect of an intermittent weekly dose of human parathyroid hormone (1-34) on osteoporosis: a randomized double-masked prospective study using three dose levels. *Osteoporos Int* 1999;9(4):296-306.
102. Jahng JS, Kim HW. Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Orthopedics* 2000;23(10):1089-94.
103. Andreassen TT, Oxlund H. The influence of combined parathyroid hormone and growth hormone treatment on cortical bone in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000;15(11):2266-75.
104. Andreassen TT, Fledelius C, Ejersted C, Oxlund H. Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone. *Acta Orthop Scand* 2001;72(3):304-7.
105. Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand* 2000;71(6):619-24.
106. Lida-Klein A, Zhou H, Lu S, Levine L, Ducayen-Knowles M, Dempster D. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17(5):808-16.
107. Halloran BP, Bikle DD, Harris J, Tanner S, Curren T, Morey-Holton E. Regional responsiveness of the tibia to intermittent administration of parathyroid hormone as affected by skeletal unloading. *J Bone Miner Res* 1997;12(7):1068-74.

108. Ma Y, Jee WS, Yuan Z, Wei W, Chen H, Pun S, et al. Parathyroid hormone and mechanical usage have a synergistic effect in rat tibial diaphyseal cortical bone. *J Bone Miner Res* 1999;14(3):439-48.
109. Li J, Duncan RL, Burr DB, Gattone VH, Turner CH. Parathyroid hormone enhances mechanically induced bone formation, possibly involving L-type voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology* 2003;144(4):1226-33.
110. Skripitz R, Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases attachment of PMMA cement to bone. *J Orthop Sci* 2001;6(6):540-4.
111. Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res* 1999;14(4):536-45.
112. Liang JD, Hock JM, Sandusky GE, Santerre RF, Onyia JE. Immunohistochemical localization of selected early response genes expressed in trabecular bone of young rats given hPTH 1-34. *Calcif Tissue Int* 1999;65(5):369-73.
113. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;13(5):793-802.

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Ralf Skripitz für die gute Einarbeitung (Vielen Dank auch Dir, Silvia!), Zusammenarbeit und Unterstützung sowie für seine Hilfe bei den Korrekturen der Erstentwürfe.

Ich wünsche ihm viel Erfolg für seine private und berufliche Zukunft.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W. Rütter, Ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie Chefarzt der Orthopädischen Klinik in der Rheumaklinik Bad Bramstedt danke ich für die Gewährung meiner Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. P. Aspenberg, Leiter des Department of orthopedics and sports medicine, INR, Faculty of Health Sciences Linköping, Schweden und seinen wissenschaftlichen Mitarbeitern B. Skoglund und A. Sudeifi möchte ich danken für die Durchführung der histologischen Schnitte und Färbungen, ihre Anleitung und Hilfe bei der histologischen Auswertung sowie für ihre Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Bei Herrn Dr. Ing. M. Hahn bedanke ich mich für die Bereitstellung der technischen Gerätschaften im Zentrum Biomechanik, UKE und für seinen wissenschaftlichen Rat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Mimiko Kujiraoka für ihre stete Hilfsbereitschaft zur Herstellung der Injektionslösungen und ihre organisatorische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. G. Delling und seinen Mitarbeitern danke ich für die Anfertigung der kontaktradiographischen Aufnahmen.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle meiner Familie danken für die jahrelange Unterstützung, Erziehung und Ausbildung.

Vielen Dank

John Markworth, Juli 2005

Lebenslauf

28. April 1977: Geboren in Hamburg, als Kind der Eheleute Prof. Dr. med. G.- P. Markworth und Maria Markworth, geborene Bittner
- 1983 – 1987: Grundschule Turmweg, Hamburg
- 1987 – 1997: Gymnasium Gelehrtenschule des Johanneums zu Hamburg
- 1997, Aug.- Dez.: Studium der Englischen Sprache an der University Boston, USA
- 1998, Aug.- Dez.: Studium der Italienischen Sprache an der Università per stranieri, Perugia, Italien
- 1999, April: Beginn des Humanmedizinstudiums der an der Universität Hamburg
- 2001, Sept.: Ärztliche Vorprüfung
- 2002, Sept.: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2004, Sept.: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Seit April 2005: Medizinisch Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

John Markworth

Juli, 2005

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.

Unterschrift