

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen**

Klinik für Orthopädie

**Prävention und Behandlung partikelbedingter Osteolysen  
durch Zoledronat Zometa®  
- Eine tierexperimentelle Studie -**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Christian Wedemeyer  
aus Essen  
2005

Dekan Univ. Prof. Dr. rer. nat. K.- H. Jöckel

1. Gutachter Univ. Prof. Dr. med F. Lör
2. Gutachter Priv.-Doz. Dr. med. O.E. Janßen

Tag der mündlichen Prüfung: 16 August 2005

---

**1 Publikationen / Poster:**

1. von Knoch M, **Wedemeyer C**, Pingsmann A, von Knoch F, Hilken G, Sprecher C, Henschke F, Barden B, L er F: A Single Dose of Zoledronic Acid Markedly Decreases Particle-Induced Bone Resorption, *Biomaterials* 2005; 26:1803-1808.
2. **Wedemeyer C**, von Knoch F, Pingsmann A, Hilken G, Sprecher C, Saxler G, Henschke F, L er F, von Knoch M: Stimulation of Bone Formation by Zoledronic Acid in Particle-Induced Osteolysis, *Biomaterials* 2005;26: 3719-3725.
3. **Wedemeyer C**, von Knoch M, Pingsmann A, von Knoch F, Hilken G, Sprecher C, Henschke F, Barden B, L er F: A Single Dose of Zoledronic Acid Markedly Decreases Particle-Induced Bone Resorption. 2. Forschungstag der Medizinischen Fakultät und der Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen, July 18, 2003, awarded for best poster.
4. **Wedemeyer C**, von Knoch F, Pingsmann A, Hilken G, Sprecher C, Saxler G, Henschke F, L er F, von Knoch M. Extensive Regional Bone Formation In A Model of Particle Induced Osteolysis After Treatment With Zoldronic Acid. 7th Essen Symposium on Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, University Duisburg-Essen, Essen, October, 6th-8th, 2004.
5. **Wedemeyer C**, von Knoch M, Pingsmann A, von Knoch F, Hilken G, Sprecher C, Henschke F, Barden B, L er F: A Single Dose of Zoledronic Acid Markedly Decreases Particle-Induced Bone Resorption. 7th Essen Symposium on Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, University Duisburg-Essen, Essen, October, 6th-8th, 2004.
6. **Wedemeyer C**, von Knoch F, Pingsmann A, Hilken G, Sprecher C, Saxler G, Henschke F, L er F, von Knoch M: Extensive Regional Bone Formation In A Model Of Particle-Induced Osteolysis After Zoledronic Acid Treatment Poster. Orthopaedic Research Society, 51th Meeting, Washington, February 2005.

**In Dankbarkeit  
meinen Eltern**

---

<b>2</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>1</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
3.1	Entwicklung der Hüftendoprothetik .....	7
3.2	Pathophysiologie der Prothesenlockerung .....	9
3.3	Klinische Bedeutung der partikelinduzierten Osteolyse .....	13
3.4	Erforschung der partikelinduzierten Osteolyse am Tiermodell .....	13
3.5	Der Wirkstoff - Bisphosphonat Zometa ® .....	15
3.6	Fragestellung der Arbeit .....	17
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
4.1	Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse .....	18
4.1.1	Versuchsprinzip .....	18
4.1.2	Versuchstierhaltung .....	18
4.1.3	Tieranzahl .....	18
4.1.4	Polyethylenpartikel .....	19
4.1.5	Polyethylenpartikelaufbereitung .....	20
4.2	Zoledronsäure .....	21
4.3	Partikelimplantation .....	21
4.3.1	Narkose und OP Vorbereitung .....	21
4.3.2	Durchführung der Operation .....	22
4.3.3	Zoledronatapplikation .....	22
4.3.4	Visiten .....	22
4.3.5	Euthanasierung der Versuchstiere .....	23
4.4	Präparation und Entnahme der Calvaria .....	23
4.5	Histologische Aufbereitung .....	24
4.6	Auswertung .....	24
4.6.1	Bildanalysesystem .....	24
4.6.2	Qualitative Beschreibung .....	25
4.6.3	Quantitative Auswertung .....	25
4.6.4	Parameter der quantitativen Auswertung .....	25
4.7	Statistik .....	27

---

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
5.1	Tägliche postoperative Visiten.....	29
5.2	Makroskopische Beurteilung der Schädelkalotten.....	29
5.3	Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte.....	29
5.4	Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte.....	32
5.4.1	Mittelliniensuturfläche .....	32
5.4.2	Osteoklastenanzahl.....	34
5.4.3	Gewebeverteilung / Gesamtes Knochengewebe .....	35
5.4.4	Knochenneubildung .....	38
5.4.5	Knochendicke.....	39
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>42</b>
6.1	Versuchsaufbau .....	42
6.2	Modell .....	42
6.3	Versuchsdauer von 14 Tagen .....	45
6.4	Anzahl der Mäuse pro Gruppe .....	45
6.5	Einmalgabe von Zoledronat .....	45
6.6	Auswertung .....	46
6.7	Grenzen des Modells.....	48
6.8	Ausblick .....	49
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Anhang: Bilder ,Tabellen, Histologie .....</b>	<b>61</b>
8.1	Bilder.....	61
8.2	Limulus Amoebocyten Assay .....	66
8.3	Herstellung der Histologie .....	67
8.4	Färben der Präparate .....	70
8.5	Tabellen.....	72
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>78</b>

### **3 Einleitung**

#### **3.1 Entwicklung der Hüftendoprothetik**

In Deutschland werden pro Jahr 180.000 Erstimplantationen und 19.000 Revisionsoperationen (Deutsche Orthopädische Gesellschaft 1995, Hochrechnung durch die Vector GmbH, Oldenburg auf alle Kliniken der BRD) durchgeführt. Weltweit beläuft sich die Zahl an Implantationen künstlicher Hüftgelenke auf 1,3 Millionen pro Jahr (Harris et al. 1995). Daher zählt der künstliche Hüftgelenkersatz heute zu den am häufigsten durchgeführten orthopädisch-chirurgischen Eingriffen.

Die Pionierleistung und Entwicklung des künstlichen Hüftgelenks begann Ende des 19. Jahrhunderts mit der Idee und den Konstruktionszeichnungen durch von Gluck aus Berlin (Mittelmeier 1988). Im Jahr 1922 führte Hey-Groves erstmalig einen künstlichen Hüftkopfersatz mittels eines Elfenbeinimplantates durch. Wiles setzte 1938 die erste Totalendoprothese ein, die aus einer metallischen Hüftpfanne und einem durch einen Schraubenbolzen im Schenkelhals fixierten Hüftkopf bestand. Heute ist die Verankerung mittels eines intramedullären Metallschaftes im Femur etabliert. Moore 1940 sowie die Brüder Judet 1946 führten dieses Verankerungsprinzip erstmals durch (Ungethüm 1988), dessen Ergebnis zunächst jedoch wenig dauerhaft und unzureichend war (Herren et al. 1987). Einen Umbruch bildete 1959 die Einführung von Polymethylmetacrylat (PMMA) als sogenannten Knochenzement durch Sir John Charnley (Charnley 1961) zur Fixierung der Prothesenkomponenten. Charnley konnte dadurch ein gutes kurz- bis mittelfristiges Ergebnis erreichen (Herren et al. 1987).

Frühkomplikationen durch Materialermüdung, Bruch des Implantates und eine hohe Anzahl an Infektionen standen zu Beginn der Ära der Hüftendoprothetik im Vordergrund (Charnley und Eftekar 1969). Durch schonendere Operationsverfahren, Verbesserung der Asepsis, Anwendung von Antibiotika sowie einer Weiterentwicklung der Werkstoffe von Pfanne und Schaft sowie des Implantatdesigns konnten in der Folgezeit die Komplikationen deutlich reduziert werden (Mulroy und Harris 1990).

Als herausragendes Problem und häufigste Langzeitkomplikation wird heute in der Hüftendoprothetik die aseptische Prothesenlockerung angesehen (Amstutz et al. 1982). Zunächst wurde der PMMA Knochenzement als Induktor der Prothesenlockerung angesehen. Untersuchungen von Piltz et al. zeigten, dass der Knochenzement das schwächste Glied der Verankerung darstellte (Piltz et al. 1993). Als Nachteile der zementierten Verankerung wurden vor allem die initiale Hitzeschädigung des Gewebes, eine durch Zement induzierte Fremdkörperreaktion (Willert et al. 1972) und die mangelnde Elastizität erkannt (Herren et al. 1987). Beobachtungen über einen längeren Zeitraum zeigten somit zunehmend, dass auch durch das Verankerungskonzept mit Knochenzement das Problem der Lockerung der Hüftprothese nach wenigen Jahren weiterhin ungelöst war. Daher wurde Anfang der siebziger Jahre die Entwicklung von Endoprothesensystemen mit einer Implantation ohne Knochenzement intensiviert. Durch eine direkte knöcherne Integration wurde eine verbesserte Langzeitstabilität erreicht. Die Entwicklungen fokussierten sich auf eine Verbesserung des Prothesendesigns und der Materialeigenschaften (Morscher et al. 1983). Der unzementierte Schaft im Femur zeigte hingegen eine höhere Prävalenz der Osteolyse und eine ausgedehntere Osteolyse als zementierte femorale Komponenten (Woolson et al. 1992). Auch die unzementierte Pfannenprothese wies jedoch eine hohe Inzidenz zur periprothetischen Osteolyse auf (Schmalzried et al. 1992). Dieses führte zu der Vermutung, dass sich die Fixation mittels PMMA nicht als das alleinige dominante Problem darstellte. Erklärungsversuche wurden in der Oberflächengestaltung der Prothesen gesucht. Durch poröse Oberflächenstruktur wurde eine verbesserte Implantatverankerung angestrebt (Ungethüm et al. 1988). Die Werkstoffe wurden verbessert, so dass heute am häufigsten Kobalt-Chrom-Molybdän-Gusslegierungen, Keramikverbundwerkstoffe sowie Titanlegierungen eingesetzt werden. Eine sehr gute Fixationstechnik der zementierten und unzementierten Prothesen wurde sowohl auf femoraler als auch auf acetabulärer Seite erzielt (Harris et al. 1995). Neben den Konstruktionsmerkmalen sind die Abriebpartikel entscheidend für die dauerhafte Prothesenverankerung. Die Gleitpaarung aus Metall und Polyethylen zeigte ein ungünstiges Verschleißverhalten, da Polyethylenpartikel im erheblichen Ausmaß entstanden. Diese Polyethylenpartikel führten zu einer Fremdkörperreaktion mit Granulombildung und begünstigten die Implantatlockerung (Willert et al. 1977).



## 3.2 Pathophysiologie der Prothesenlockerung

### *Der Mechanismus der Osteolyse*

Die Pathogenese der aseptischen Prothesenlockerung bleibt bis heute umstritten. Dennoch wurden einige Faktoren, die zu dieser Prothesenlockerung führen identifiziert. Die Abriebpartikel nehmen hierbei eine wichtige Rolle ein. So wurde in den letzten 25 Jahren die biologische Reaktion auf verschiedenste Partikelarten untersucht (Willert 1977, Harris et al. 1994). Es gibt daher Hinweise, dass die verschiedenen Partikelarten humane Zellen in-vitro schädigen und eine Fremdkörperreaktion (Maloney et al. 1993) sowie Knochenresorption in-vivo hervorrufen (Murray et al. 1990).

### *Abriebpartikel*

Durch die Artikulation des Metallkopfes der Prothese mit der Polyethylenpfanne entstehen durch Scher- und Abriebkräfte unzählige Abriebpartikel. Mehr als  $10^9$  Partikel wurden pro Gramm in dem der Prothese umgebenden Gewebe gefunden (Margevicius et al. 1994). Clarke et al. und Lewis et al. schätzten die Anzahl jährlich gebildeter Partikel im Bereich von Milliarden. Vornehmlich entstehen bei diesem Prozess zu einem hohen Prozentanteil Polyethylenpartikel gefolgt von PMMA Knochenzement-Partikeln, Titanpartikeln und Knochenabriebpartikeln (Jacobs et al. 2001).

Zement- und Abriebpartikel gelangen in die freie Gelenkhöhle und über Phagozytose in die nach ursprünglich meist totaler Resektion neu gebildete Gelenkkapsel. Dort geben sie -je nach anfallender Menge- Anlass zu einer verschieden stark ausgeprägten Fremdkörperreaktion. Solange wenig oder mäßig viel Abrieb verarbeitet werden muss, kann dieses System kompensiert werden. Tritt aber die Dekompensation ein, d.h. die Partikel können z.B. nicht über das Lymphgefäßsystem abtransportiert werden, treten ausgedehnte Granulome auf, die häufig zentral fibrinoid nekrotisieren. Die Sklerose nimmt stark zu und greift auf die nach der Implantation entstandene dünne Bindegewebsmembran zwischen Polyethylenpfanne und dem angrenzenden Beckenknochenlager über. Diese Membran beginnt sich nun an der Reaktion auf die Abriebfremdkörper zu beteiligen, was

über resorptive Vorgänge zum Schwinden des Knochenlagers führt (Willert et al. 1972 - 1981).

Die Osteolyse beginnt bei vielen Implantattypen am Äquator der Pfanne und setzt sich zur Kuppel der Pfanne fort, bis das Implantat vollständig gelöst ist (Schmalzried et al. 1992).

Schmalzried et al. konnten eine Membran parallel zur Hüftpfanne radiologisch darstellen und durch einen radiologisch sichtbaren Spalt von  $> 2$  mm charakterisieren. In diesem Spalt wurden eine Vielzahl von Polyethylenpartikeln (UHMWP = ultra high molecular weight polyethylene particles), die von Makrophagen inkorporiert worden waren, sowie inflammatorische Zellen gefunden. Ein Hauptgrund der späten aseptischen Prothesenlockerung ist biologischer und nicht mechanischer Natur (Schmalzried et al. 1992).

Schmalzried et al. beschrieben 1992 auch das Fortschreiten der Osteolyse auf der femoralen Seite. Sie fanden in der Histologie um den Schaft der Prothese zahlreiche mit kleinen Polyethylenpartikeln beladene Makrophagen. Die Histologie entsprach der an der Pfanne.

Die Polyethylenpartikel-induzierte Osteolyse zeigte sich in den letzten Jahren als ein vorherrschender Grund der aseptischen Prothesenlockerung (Shanbag et al. 1994, Maloney et al. 1995, Margevicius et al. 1994). Die Lebensdauer von Hüftendoprothesen ist durch Lockerungsprozesse, die aus der biologischen Reaktion auf Abriebpartikel resultieren, limitiert (Willert et al. 1990, Santavirta et al. 1999). Die ausschließlich mechanischen Erklärungsversuche Ende der 80er Jahre durch Harris, Zalenkski und Jasty, d.h. die Prothesenlockerung durch Mikrostress und Relativbewegungen der Pfanne zu erklären, wurden weitgehend verlassen (Harris et al. 1989).

### *Weitere Erklärungsversuche*

Neuere Erkenntnisse unterteilten die Prothesenlockerung in eine frühe Form und eine späte Form. Skoglund et al. 2003 beschrieben, dass die frühe Prothesenlockerung nicht durch die Polyethylenpartikel erklärt werden konnte. Sie schrieben dem hydrostatischen Druck der Gelenkflüssigkeit und Scherkräften auf die fibröse Bindegewebsmembran, die die Prothese umgibt, eine entscheidende Rolle zu. Durch Computersimulationen konnte herausgefunden

werden, dass unter Belastung des Knie- und des Hüftgelenks ein intraartikulärer Druck von bis zu 700 mmHg entsteht (Aspenberg et al. 1996/1998, Schmalzried et al. 1997). So zeigte eine weitere Studie aus dem Jahr 1998 von van der Vis et al., dass ein Druck von 200 mmHg im Gelenk von Kaninchen verabreicht über 2 Wochen eine massive Knochenresorption auslöst.

Inwiefern das Immunsystem eine Rolle bezüglich der aseptischen Prothesenlockerung und der periprothetischen Osteolyse spielt, ist Gegenstand der Diskussion. Evans et al. 1974 demonstrierte, dass neun von vierzehn Patienten mit gelockerten Metall auf Metall-Prothesen kutane Hypersensitivitäten aufwiesen. Spätere Studien von Brown et al. 1977 und Rooker et al. 1980 zeigten, dass eine Metallhypersensitivität nicht mit der Prothesenlockerung assoziiert werden kann. Auch zeigten sich bei in vitro Versuchen nicht phagozytierbare PMMA Partikel (Santavirta et al. 1991) und nicht phagozytierbare Polyethylenpartikel (Santavirta et al. 1993) als immunologisch relativ inert.

#### *Die Rolle der Osteoklasten*

Die Mehrzahl der Autoren stellte fest, dass der dominante Prozess eine Zytokinproduktion als Antwort auf die Phagozytose von Abriebpartikeln ist, und dieses führt zum Anstieg der Proliferation und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen in reife Osteoklasten (Silva MJ 2002). Da die Osteolyse mit der Funktion der Osteoklasten assoziiert wird, fokussierten die Wissenschaftler ihre Aufmerksamkeit besonders auf die Rolle der Osteoklasten. Die neuen Erkenntnisse im Verständnis der Zell-Zell-Interaktion durch Zytokine sind von großer Bedeutung in der Osteolyse-Forschung.

Die Abriebpartikel initiieren eine inflammatorische Reaktion, bei der kleine Partikel (<10 µm) von Makrophagen phagozytiert werden, und es hierdurch zu der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, z.B. Tumor Nekrose Factor- $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL-1) und Interleukin 6 (IL-6) kommt (Schwarz et al. 2000). Im Allgemeinen geht man davon aus, dass diese Zytokine über die Stimulation von Osteoklasten Osteolysen verursachen, welche zur Lockerung der Implantate führen können (Plenk 1998). Von vielen Autoren wird daher der Osteoklast als essentiell für die Knochenresorption angesehen (Mundy 1993 und 1999, Teitelbaum et al. 1995, Amling et al. 2000). In der Literatur gibt es aber auch

Arbeiten, in denen berichtet wird, dass aktivierte Makrophagen direkt, d.h. ohne Stimulation von Osteoklasten, Knochengewebe lysieren können (Sabokbar et al. 1997).

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Sie gehören zu der Familie der Monozyten / Makrophagen (Teitelbaum et al. 1995). Der Osteoklast ist in der Lage große Mengen proteolytischer Enzyme zu synthetisieren. Durch Protonenpumpen im Bürstensaum („ruffled border“) schafft der Osteoklast ein saures Milieu im extrazellulären Resorptionskompartement. Durch lysosomale Enzyme (Cystein Proteasen, Kathepsinen, Kollagenasen) werden Hydroxylapatit Kristalle aus der Knochenmatrix gelöst und Kollagenfasern abgebaut. Ihre Rekrutierung wird durch verschiedene, von Makrophagen produzierte, proinflammatorische Enzyme beeinflusst: TNF –  $\alpha$ , Interleukine (u.a. IL-1 und IL-6), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) und Prostaglandine der E Serie (Mundy 1993). Mononukleäre Phagozyten dienen als Präkursoren der Osteoklasten sowie als parakrine Promotoren des osteoklastischen Phänotyps. Die Natur der gemeinsamen Präkursoren von Makrophagen und Osteoklasten muss aber noch ermittelt werden (Takeshita et al. 2000).

Takeshita et al. schlugen aufgrund ihrer Untersuchungen vor, dass von drei Stadien bei der Differenzierung von Osteoklasten auszugehen ist.

1. Pro-Osteoklast (spindelförmige Makrophagen)
2. Prä-Osteoklast ( kleine, runde mononukleäre TRAP positive Zelle)
3. reifer Osteoklast ( multinukleäre TRAP positive Zelle)

Den Phänotypen der drei genannten Stadien kommt eine besondere Bedeutung vor allem durch die Betrachtung der Erkenntnisse des OPG / RANKL / RANK-Zytokinsystems zu. Dieses System koordiniert die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und ist verantwortlich für die Differenzierung der o.g. drei Stadien der Osteoklasten. RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) ist ein Transmembranprotein an der Zellmembran der Prä-Osteoklasten. RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) auch bekannt unter der Bezeichnung TRANCE (tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine) wird von den Prä-Osteoblasten und Immunzellen gebildet. Wenn RANKL an RANK bindet, wird eine intrazelluläre Kaskade aktiviert, die zur Osteoklasten-Differenzierung führt. Das dritte Zytokin ist das OPG (Osteoprotegerin), das am selben RANK Rezeptor durch eine Osteoklastenhemmung knochenprotektive

Eigenschaften besitzt. Zusammengefasst reguliert das Verhältnis OPG / RANKL die Osteoklastendifferenzierung und somit die Osteolyse (Khosla 2001).

Die Zielzelle Osteoklast wurde auch zum Gegenstand der pharmakologischen Forschung. Bisphosphonate wirkten auf Osteoklasten und inhibierten die Osteoklasten-Reifung und die Osteoklastenfunktion an dem Ort der Knochenresorption (Evans et al. 1994).

### **3.3 Klinische Bedeutung der partikelinduzierten Osteolyse**

Aufgrund der in den letzten Jahrzehnten kontinuierlichen Zunahme von Gelenkendoprothesenimplantationen und der Ausweitung der Indikationsstellung auf immer jüngere Patientengruppen hat sich die Häufigkeit der Prothesenwechseloperationen stark erhöht, so dass zur Zeit bereits eine Wechseloperation auf zehn Neuimplantationen kommt (nach einer sehr ausführlichen und umfassenden Umfrage unter den Kliniken für Chirurgie, Orthopädie und Unfallchirurgie, die von der Vector GmbH, Oldenburg durchgeführt wurde, ergaben sich bei einer Rücklaufquote von 26,5 % der angeschriebenen Kliniken ein Anteil der Erstimplantationen von Hüftendoprothesen von ca. 88 % (45.636 Fälle und der Revisionsoperationen von ca. 12 % (5.793)).

In einigen Studien zeigten 20 % der prothesenimplantierten Patienten über den Zeitraum von 20 Jahren eine bedeutende Prothesenlockerung als Resultat der Abriebpartikel-induzierten Osteolyse (Kim YH 1999).

Die gelockerten Prothesen benötigen die oben beschriebene Wechseloperation. Eine Implantation einer neuen Prothese ist unumgänglich (Breusch et al. Klinikleitfaden Orthopädie 2002). Diese erweist sich in den meisten Fällen als weniger effektiv und besitzt -verglichen mit dem ersten Implantat- eine deutlich kürzere Haltbarkeit (Callaghan et al. 1985 und Hanssen et al. 1988).

### **3.4 Erforschung der partikelinduzierten Osteolyse im Tiermodell**

Cohen war einer der ersten Wissenschaftler, der die Fremdkörperreaktion auf orthopädische Implantationswerkstoffe untersuchte. Metallpartikel wurden Hamstern und Ratten subkutan injiziert, danach wurden die Tiere ein Jahr lang beobachtet. Cohen zeigte,

dass diese Werkstoffe in großer Form sich inert darstellten, aber in Partikelform fähig waren, eine inflammatorische Reaktion zu initiieren. Die Ergebnisse der Tierstudien hatten vor allem die Annahme unterstützt, dass große Implantate gut biologisch toleriert wurden (Cohen 1959).

Miller et al. 1978 untersuchten die Antwort auf diaphysäre Oberschenkelimplantate bei Hunden. Bis zur 42. Woche nach Implantation gab es keinen Hinweis auf eine Osteonekrose oder sekundäre Entzündung auf den Knochenzement (PMMA). In einem Kaninchenmodell verglichen Paiement et al. 1986 die Antworten auf große Implantate und PMMA Partikel unter Zuhilfenahme eines Knochenkammer-Modells bei Kaninchen und Mäusen. Die Knochenzement (PMMA)-Partikel induzierten eine Gewebereaktion ähnlich der Reaktion an sich lösenden Prothesen am Übergang zwischen Zement und Knochen. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Fremdkörperreaktion bei den großen Implantaten des gleichen Werkstoffes; die zelluläre Antwort auf die großen Implantate war vornehmlich eine Fibrosierung. Goodman et al. 1988 beschrieben ähnliche Histologien der Tibiae von Ratten im Anschluß einer Implantation von großen Materialien und PMMA Partikeln.

Gelb et al. benutzten ein Air-pouch Modell um die Auswirkung der Partikelgröße, Morphologie und Oberfläche einer akuten inflammatorischen Antwort bei Ratten zu bewerten. Kleinere Partikel (weniger als 20  $\mu\text{m}$ ) erzeugten eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion als große Partikel (50 bis 350  $\mu\text{m}$ ). Unregelmäßig geformte Partikel führten zu einer ausgeprägteren Reaktion als kugelförmige. Große Partikel induzierten einen größeren Anstieg der Anzahl weißer Blutzellen, eine erhöhte Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> und der neutralen Metalloproteinase. Hingegen zeigten kleine Partikel einen größeren Anstieg des TNF- $\alpha$  (Gelb et al. 1994).

Jasty et al. 1992 gingen der Rolle des Immunsystems hinsichtlich der Reaktion auf Abriebpartikel in einem Mausmodell nach. Die Tiere besaßen unterschiedliche Immunkompetenzen (Immunkompetente Mäuse; Immundefizienz von T-Zellen; von T- und B-Zellen; und von T-, B- und Natürlichen Killerzellen). Bei allen Mäusen, unabhängig von ihrer Immunkompetenz, führte eine subkutane Injektion von PMMA-Partikel-Pulver zu einem Granulationsgewebe mit Makrophagen und Riesenzellen. Diese Ergebnisse deuteten an, dass das Immunsystem (T- und B-Zellen) keine wichtige Funktion bezüglich der zellulären Reaktion auf Abriebpartikel einnehme.

Tierexperimente wurden ebenfalls benutzt um den Effekt von Metallpartikeln zu überprüfen. Rae et al. 1986 applizierten Titanpartikel und Partikel aus Titan-Legierungen in die Kniegelenke von Mäusen und untersuchten das Gewebe nach 52 Wochen. Die Metallpartikel wurden gut toleriert, es bestand kein Hinweis auf eine chronische Entzündung oder Nekrose und Riesenzellen waren selten.

Howie und Vernon-Roberts et al. 1988 führten eine ähnliche Studie durch, in der Partikel aus einer Kobalt-Chrom-Legierung ins Kniegelenk appliziert wurden. Diese Partikel erzeugten eine synoviale Ulzeration, Makrophagen-Infiltration und eine Nekrose. Die Intensität der Makrophagenreaktion verminderte sich zwischen der ersten und zweiten Versuchswoche und blieb danach auf konstantem Niveau. Die Forschung der letzten Jahre konzentrierte sich vornehmlich auf die periprothetische Osteolyse durch Titanpartikel, da die Titanpartikel einfach und kostengünstig hergestellt werden konnten und somit für die Partikelforschung in ausreichendem Maße verfügbar waren.

Die Rolle der Polyethylenpartikel wurde dennoch nicht außer Acht gelassen. Howie et al. 1988 beurteilten den Effekt von Polyethylenpartikeln auf die aseptische Lockerung in einem Rattenmodell. Ein Zylinder aus PMMA Knochenzement wurde durch einen intraartikulären Zugang in das distale Femur platziert, und anschließend wurden Polyethylenpartikel ins Kniegelenk injiziert.

Millett et al. 2002 beschrieben mit einem ähnlichen Versuchsaufbau die Effekte von Alendronat auf die Partikel-induzierte Osteolyse.

Shanbag et al. 1997 etablierten ein in vivo Kaninchen Modell und applizierten eine Mischung von Partikeln aus Polyethylen, Titanlegierung und Kobalt-Chrom-Legierung in die Hüftgelenkshöhle. Die Hüfte wurde zuvor durch eine unzementierte totale Hüftendoprothese ersetzt. Durch die Gabe von Alendronat konnte er eine Inhibition der Osteolyse erzielen. Schwarz et al. 2000 popularisierten das von Merkel et al. 1999 entwickelte Modell und demonstrierten an Mäusen, denen sie Titanpartikel auf die Calvaria implantierten, die Wirksamkeit von Alendronat.

### **3.5 Der Wirkstoff – Bisphosphonat**

Die Bisphosphonate sind synthetische Analoga des in der Natur vorkommenden Pyrophosphatmoleküls. Sie weisen eine höhere Stabilität als Pyrophosphat hinsichtlich der

enzymatischen Hydrolyse durch Osteoklasten auf. Durch Modifizierung der Seitenketten wurde eine große Anzahl von Bisphosphonaten mit verschiedenen klinischen Aktivitäten und Wirkstärken produziert (Green 1996).

Bisphosphonate gelten heute als integraler Bestandteil der Behandlung von Tumor bedingten Skelettkomplikationen besonders der Skelettmetastasen und der Tumor induzierten Hyperkalzämie. Sie hatten bereits in mehrfachen klinischen Studien zeigen können, dass sie die metastasenbedingte Knochenresorption effektiv hemmen konnten (Berenson et al. 1998, Hortobagyi et al. 1998). Die Bisphosphonate akkumulierten in der mineralisierten Knochenmatrix und machten sie resistent gegenüber der Absorption durch Osteoklasten. Die Osteoklasten wurden in ihrer osteolytischen Aktivität gehemmt und erfuhren eine verkürzte Lebenszeit (Guiese et al. 1998, Mundy et al. 1999). Sato et al. 1991 führten dieses auf die veränderte Ionenpermeabilität des Resorptionssaumes („ruffled border“) der Osteoklasten zurück, die durch Bisphosphonate induziert worden ist. Dieser Mechanismus führte zu einem Resorptionsstopp und die Zellen verloren ihren Bürstensaum. Weiter inhibierten sie die Rekrutierung der Osteoklasten an den Ort der Knochenresorption (Evans et al. 1994) und unterdrückten die Funktion reifer Osteoklasten (Green et al. 1994).

Stickstoff enthaltende Bisphosphonate -wie das hier verwendete Zoledronat- zeichneten sich auch durch ihre inhibitorische Wirkung auf den Mevalonatstoffwechsel aus (Luckmann et al. 1998, Rogers et al. 1999, Russell et al. 1999, Fisher et al. 2000). In diesem Stoffwechsel werden nicht nur Cholesterole und Sterane, sondern auch Isoprenoid Seitenketten für Signalproteine zur Verankerung in Membranstrukturen synthetisiert. Diese enzymatische Reaktion ist die sogenannte Prenylierung. Die Prenylierung von kleinen GTP spaltenden Enzymen ist zum Beispiel für die Lokalisierung des Onkogenproduktes Ras an der Zellmembran wichtig. Ohne Ras ist die Signaltransduktion und Informationsübertragung in den Kern unterbrochen und somit die Aktivität und Zellmorphologie der Osteoklasten und Tumorzellen gehemmt (Russell et al. 1999). Die Hemmung der Signaltransduktion, d.h. die Senkung der Produktion von Zytokinen (z.B. Interleukin 6 [IL-6]) (Derenne et al. 1999), kann dann zu Veränderungen in der Zytoskelett Organisation, in der Ausbildung eines Bürstensaums (Membran-Ruffling) und zur Apoptose führen. (Russell et al. 1999)



Bisphosphonate haben nicht nur eine Wirkung auf die Osteoklasten, sondern regulieren auch direkt die Zellproliferation, Differenzierung und Genexpression von menschlichen Osteoblasten (Reinholz et al. 2000). In-vitro Versuche von Reinholz et al. 2000 zeigten, dass eine Pamidronat-Behandlung die Konzentration der zellulären Proteine, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Typ I Kollagen Sekretion steigerten und die knochenbildende Aktivität der Osteoblasten verstärkten.

Auch in vivo Studien im Tierexperiment und am Menschen demonstrierten positive Effekte auf die Knochensubstanz. So zeigten Millett et al. im Jahr 2002 einen knochenprotektiven Effekt durch Alendronat in ihrem modifizierten Rattenmodell (nach Howie et al. 1988). Durch den Einsatz von Alendronat wurde eine Reduzierung des Verlustes an Knochensubstanz nach unzementierter totaler Hüftarthroplastik beim Menschen erreicht (Venesmaa et al. 2001).

In beiden Experimenten wurden die Bisphosphonate täglich appliziert. Neue Bisphosphonate wie das Zoledronat, die nur einer einmaligen Applikation bedürfen, sind hinsichtlich der Vermeidung oder Behandlung partikelinduzierter Osteolysen nicht untersucht worden.

### **3.6 Fragestellung der folgenden Arbeit**

Ausgehend von der These, dass die Lebensdauer von Implantaten unter anderem durch Abriebpartikel limitiert ist, welche durch eine osteolytische Kaskade Implantatlockerungen bewirken können, war es Ziel dieser Arbeit, einerseits ein in-vivo Modell mit kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikeln zu etablieren und andererseits die Wirksamkeit einer Einmalgabe von Zoledronat auf die Osteolysen zu untersuchen.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse**

#### **4.1.1 Versuchsprinzip**

Gesunde 14 Wochen alte, männliche C57 BL / J6 Mäuse wurden in je vier Gruppen eingesetzt. Die Gruppe I erhielt keine Partikel und bildete die Kontrollgruppe. Die Tiere der Gruppen II, III und IV erhielten  $6 \times 10^6$  (0,05 ml) Polyethylen Partikel implantiert. Die Mäuse der Gruppe III erhielten Zometa® Zoledronat (Novartis Pharma, Basel, Schweiz) direkt im Anschluss an die Operation, die Versuchstiere der Gruppe IV erhielten Zoledronat vier Tage nach der Operation. Nach 14 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere euthanasiert und der Schädelknochen histologisch aufbereitet.

#### **4.1.2 Versuchstierhaltung**

Die 28-42 g schweren Mäuse wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (Leiter Prof. Dr. med vet. K. Militzer) gestellt. Die Tiere wurden in Einklang mit den entsprechenden Richtlinien der Universität Essen und der Landesregierung von Nordrhein-Westfalen / Düsseldorf gehalten. Es lag ein genehmigter Antrag auf Tierversuch (Nr.10082001) vor.

Die Tierhaltung war standardisiert:

Tag-Nacht Rhythmus (12 Stunden hell / 12 Stunden dunkel). Raumtemperatur  $22 \pm 2$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, Luftumwälzung 15-fach pro Stunde. Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen postoperativ zur Verhinderung von Stress und Infektionen alleine gehalten. Sie erhielten Wasser und artgerechtes Trockenfutter ad libidum.

#### **4.1.3 Tieranzahl**

Um eine statistische Aussage über unser Experiment machen zu können, wurde eine Power Analyse vom Department of Biostatistics der Mayo Clinic Rochester / Minnesota durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass pro Gruppe 7 Versuchstiere eingesetzt werden

sollten. Hingegen wurden in anderen Arbeitsgruppen meistens ein Gruppenstärke von ca. 5 Versuchstieren eingesetzt. Schwarz et al. 2000 nutzten 5 Tiere pro Gruppe in ihrer Studie zur Etablierung eines Titanpartikel induzierten Osteolysemodells an Mäusecalvariae. In einer anderen Studie von Schwarz et al. 2000 in der die Rolle des TNF- $\alpha$  untersucht wurde, wurden Gruppenstärken von 3-8 Tieren zusammengestellt. In einer weiteren Studie untersuchten Childs et al. 2001 den Effekt von Etanercept im Hinblick auf die Abriebpartikel induzierte Osteolyse. Sie wählten 5 Tiere in jeder Gruppe.

#### 4.1.4 Polyethylenpartikel

Es wurden kommerziell erhältliche Ceridust®-Polyethylenpartikel vom Typ VP 3610 (Firma Clariant, Gersthofen, Deutschland) bestellt und kostenfrei von der Firma zur Verfügung gestellt. Laut Herstellerangaben waren 50 % der Partikel kleiner als 5 $\mu$ m und 90% kleiner als 9 $\mu$ m. Eine Partikelanalyse am AO-Forschungsinstitut, Davos, Schweiz zeigte, dass mehr als 34% der Partikel kleiner waren als 1  $\mu$ m. Die Partikelgröße betrug mittlere 1,74  $\mu$ m  $\pm$  1,43  $\mu$ m (Median 1,41  $\mu$ m). Das Minimum lag bei 0,05  $\mu$ m, das Maximum bei 11,06  $\mu$ m.

Es wurde folgendes Prozedere zur Größenbestimmung der Partikel durchgeführt. Die Partikel wurden in ultrareinem H<sub>2</sub>O suspendiert und mit einem 0,1 $\mu$ m Polycarbonfilter gefiltert (Millipore, Bedford, MA, USA). Die Partikel wurden mit 10 Nanometer Gold / Palladium (Au / Pd 80% / 20%) beschichtet und mit einem Elektronenmikroskop abgelichtet (Niedrigspannung, 3-5kV; Hitachi FESEM S-4100, Kyoto, Japan). Die Fläche und der Perimeter von 1984 Partikeln wurde mit dem Programm PC-Image 2.2.03 (Foster Findlay Associates Ltd, Newcastle upon Tyne, Grossbritannien) gemessen und mit Excel 2000 ausgewertet (Firma Microsoft, New York, USA). Hierbei wurde die Partikelgröße mit einem neu entwickelten Algorithmus semiautomatisch ermittelt (Sprecher et al. 2001). Dieser Algorithmus dient der Bestimmung des Equivalent Circle Diameter (ECD), welcher Größenangaben von Partikeln unabhängig von verformten oder verdrehten Partikeln durch eine präzise Beschreibung der Partikeloberfläche zulässt. Der ECD ist laut ASTM F1877-98 definiert als:  $ECD = (4A/\pi)$ .

#### 4.1.5 Polyethylenpartikelauflbereitung

Die Polyethylenpartikel wurden mit Ethylenoxid sterilisiert. Die weitere Partikelauflbereitung wurde unter sterilen Bedingungen in der sterilen Kammer („Laminar Box“) durchgeföhrt. Die Polyethylenpartikel wurden in einer Ethanollösung für 24 Stunden in einem Schüttelbad gewaschen. Zur Waschung wurde 70 % Ethylalkohol verwendet. Das Wirkprinzip der Ethanolwaschung begründet sich auf der Eiweißdenaturierung. Diese Waschung wurde zweimalig durchgeföhrt. Danach wurden die Polyethylenpartikel mittels Zentrifuge von der Ethanollösung getrennt. Im folgenden Arbeitsschritt wurden die Partikel im Desicator getrocknet und in endotoxinfreien Proberöhrcchen (Firma Falcon, Franklin Lakes, USA) gelagert.

##### *Limulus Amoebocyten Assay*

Die Polyethylenpartikel wurden mittels des Limulus-Assay (Charles River, Kent, Großbritannien) auf Endotoxinkontamination überprüft. Der Limulus-Assay enthält ein Limulus Amoebocyten Lysat (LAL), welches aus gereinigten Amoebocyten des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) gewonnen wird, und dient zur qualitativen Bestimmung gramnegativer bakterieller Endotoxine durch gerinnungsbedingte Gelbildung (Gel Clot).

Das biologische Prinzip, dass Bakterien im Pfeilschwanzkrebs eine intravaskulär aktivierte Koagulation auslösen, hat Frederick Bang beobachtet. Gemeinsam entdeckte er mit F.B. Levin, dass der Wirkstoff, der diese Gerinnungskaskade auslöst, in den Amoebocyten, den zirkulierenden Blutzellen des Krebses vorhanden war, und dass Endotoxine eine Gelierungsreaktion des Amoebocyten Lysates durch einen enzymatischen Prozess bewirken. Serinproteasen im Amoebocytenlysat werden in Gegenwart von den Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aktiviert, dieses führt zu einer Koagulationskaskade, die ein in großer Menge vorhandenes Protein, das Koagulogen, verändert, so dass ein eiweißartiges Gel entsteht (Bang et al. 1968).

## 4.2 Zoledronsäure

Zoledronsäure ist eine neue Generation Bisphosphonat, das einen Imidazolring enthält und die Knochenresorption der Osteoklasten inhibiert. Es ist um einiges potenter bezüglich der Vermeidung einer 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-induzierten Hyperkalzämie und Freigabe von Kalzium aus den Zellen als andere Bisphosphonate früherer Generationen (Green et al. 1994). Es bestanden aber keine Unterschiede in der Potenz und im Wirkspektrum zwischen Zoledronsäure und Pamidronat in vergleichenden in vitro Studien (Reinholz et al. 2000). Hingegen führten in vivo Experimente mit heranwachsenden Ratten, die über einen kurzen Zeitraum Zoledronsäure erhielten, zu einem substantiellen Anstieg des ossären Kalzium- und Hydroxyprolinegehaltes sowie der radiographisch ermittelten Knochendichte verglichen mit Pamidronat (Pataki et al. 1997). Die häufigsten Nebenwirkungen äußerten sich in Fieber, Schwindel, Obstipation, Dyspnoe, Hypophosphatämie und Hypokalzämie (Cheer et al. 2001).

Zoledronsäure wird chemisch als (1-Hydroxy-2-imidazol-1-yl-phosphonoethyl) Bisphosphonsäure – Monohydrat bezeichnet. Die Summenformel lautet  $C_5H_{10}N_2O_7P_2 + H_2O$ . Die Molekülmasse beträgt 290,1 g/mol. Zoledronsäure ist ein weißes Pulver. Weitere Inhaltsstoffe sind Mannitol, USP (ein inaktives Trägermedium) und Natriumcitrat (als Puffer).

Zometa® Zoledronat wurde von der Firma Novartis kostenlos zur Verfügung gestellt.

## 4.3 Partikelimplantation

### 4.3.1 Narkose und OP Vorbereitung

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 70-80 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 5-7 mg/kg Körpergewicht Xylazin anästhesiert und auf eine Wärmplatte mit 37 °C gelegt.

Den Versuchstieren wurde das Kopffell vorsichtig rasiert. Zur Vermeidung einer postoperativen Komplikation durch Entzündung der Augen wurden diese mit Augensalbe (Bepanthen Roche, Basel, Schweiz) geschützt. Die Haut wurde mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) gründlich dreimal desinfiziert. Es wurden

Einmalskalpelle (Aeskulap, Tutlingen, Deutschland) und sterile Einmal Operationshandschuhe Peha Taft (Hartmann, Heidenheim, Deutschland) verwendet. Weiter wurden sterile Pinzetten, Luer und Scheren (Luttermann, Essen, Deutschland) für die Operationen genutzt.

#### **4.3.2 Durchführung der Operation**

Das Kopffell wurde auf einer Länge von ca. 10 mm längs der Mittellinie eröffnet. Das Periost wurde auf einer Fläche mittels stumpfer Präparation von ca. 1.0 cm x 1.0 cm dargestellt, aber intakt gelassen.

Die Polyethylenpartikel wurden mit einem scharfen Löffel auf das Periost aufgetragen und gleichmäßig über die Kalotte verteilt. In der Kontrollgruppe wurde die Operation ohne Implantation der Partikel durchgeführt.

Die Haut wurde wieder adaptiert. Der Hautverschluß erfolgte mit 4.0 Ethilon Nahtmaterial (Ethicon, Sommerville, NJ, USA). Die Mäuse kamen nach dem Abklingen der Narkose von der Wärmeplatte wieder in ihre Käfige zurück.

#### **4.3.3 Zoledronatapplikation**

Den Tieren der Gruppe III wurde direkt postoperativ Zometa® Zoledronat (Novartis Pharma, Basel, Schweiz) 25 µg / kg subkutan ins Nackenfell appliziert.

Die Tiere der Gruppe IV erhielten die oben genannte Dosis am vierten postoperativen Tag subkutan ins Nackenfell.

#### **4.3.4 Visiten**

Tägliche Visiten der Mäuse über die 14-tägige Versuchsdauer wurden durchgeführt. Beurteilt wurden der Allgemeinzustand, das Fress- und Trinkverhalten sowie mögliche postoperative Komplikationen: Blutung, Wundheilungsstörung und Infektion der Wunde bzw. Injektionsstelle und der Augen.

#### **4.3.5 Euthanasierung der Versuchstiere**

Die Tiere aller vier Gruppen wurden am 14. postoperativen Tag in der Kohlendioxid-Kammer euthanasiert.

#### **4.4 Präparation und Entnahme der Calvaria**

Zunächst wurde die Maus auf eine Korkunterlage mit kunststoffbeschichtetem Papier gelegt und fixiert. Danach wurde eine Stichinzision mittels eines Skalpells durch das Fell der Maus gemacht und mit dem spitzen Skalpell die Inzisionstelle vergrößert. In diese vergrößerte Inzision ging man vorsichtig mit der spitzen Schere ein und schnitt das Fell zirkulär um den Hals ein und löste spinnwebenartiges Bindegewebe stumpf mit der Schere oder dem Finger. Das Fell wurde ein wenig unter Zug rumpfwärts zum Thorax gezogen sowie nach rostral, um klar den Übergang von Occiput zur Halswirbelsäule zu sehen. Unter Beachtung der Operationsnarbe und dem vorhandenen Granulationsgewebe wurde die Maus auf den Rücken gedreht und man präparierte zunächst das Fell am Unterkiefer, so schützte das Fell den Parietalknochen, der möglicherweise durch die Polyethylenpartikel induzierten Osteolysen während der Präparation geschädigt worden ist. Mit dem Finger wurde der Übergang des Occiput zur Wirbelsäule aufgesucht und man durchtrennte mit der kräftigen Schere die Wirbelsäule, Hals und Nackenmuskulatur und die Halsweichteile. Mit der Pinzette wurde die Kaumuskulatur von der Unterkiefermuskulatur stumpf auseinander gedrängt, so dass man mit der spitzen Schere den Processus mandibularis einseitig durchtrennen konnte. Dies wurde auf der gegenüberliegenden Seite ebenfalls durchgeführt. Nun konnte der Unterkiefer samt Zunge, Pharynxmuskulatur und Trachea abgetragen werden. Man sah nun eindeutig den harten Gaumen und die Molaren im vorderen Drittel, im mittleren und hinteren Drittel ist die Schädelbasis auszumachen.

Als nächster Schritt wurde die spitze Schere unter Schonung der Kalotte in das Foramen magnum eingeführt, und man führte einen Schnitt entlang der Schädelbasis zwischen Knochen und Gehirngewebe entlang der Medianlinie Richtung harten Gaumen und Nasobasis durch. Wiederum wurde die spitze Schere ins Foramen magnum eingeführt, nun

wurde die Schädelbasis in zwei Teile entlang dem Übergang von Parietalknochen zur Basis in Höhe des Meatus acusticus externus durchtrennt. Zusätzlich schnitt man die Jochbögen an ihren Ansätzen durch. Nun konnte man problemlos mit der Pinzette die Basis in zwei Teilen samt Kaumuskelatur abheben und das weiße Gehirngewebe wurde sichtbar und entfernt.

Zum Schluss wurde das Kopffell entfernt und die noch nicht entfernte Muskulatur abgetragen. Der Knochen wurde kurz in physiologischer Na Cl - Lösung gewaschen und in die Schaffer'sche-Lösung (1440 ml Methanol, 750 ml Formal 40 % neutral und 60 ml Puffer (9,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,74 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 30,8 g Glucose; ad 1l Aqua dest.) überführt.

#### **4.5 Histologische Aufbereitung der Schädelknochen**

Es wurden unentkalkte, 4  $\mu\text{m}$  dicke Knochenschnitte angefertigt. Diese Knochenschnitte wurden nach Giemsa, Goldner und immunhistochemisch mit Tetracyclin resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung gefärbt.

Zur histologischen Aufbereitung und Färbung der Präparate siehe 9. Anhang.

#### **4.6 Auswertung**

##### **4.6.1 Bildanalyzesystem**

Die Bildanalyse wurde mittels einem computergestützten Bildanalyzesystem Image Tool Version 3.0 (University of Texas Health Science Center Saint Antonio (UTHSCSA), San Antonio, USA) an den nach Giemsa, Goldner und immunhistochemisch gefärbten Tetracyclinresistenten sauren Phosphatase-Präparaten durchgeführt. Über ein Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden mit 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung die Gesichtsfeldauschnitte per Digitalkamera Nikon Coolpix 995 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) abfotografiert und in einen Computer übertragen. Unter Zuhilfenahme des Bildanalyzesystems und Aufnahmen der Eichskala in verschiedenen Vergrößerungen konnte das Bildanalyzesystem geeicht werden und somit konnten im Anschluss die unten beschriebenen histomorphometrischen Parameter ermittelt werden.



#### **4.6.2 Qualitative Beschreibung**

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch bei Übersichtsvergrößerungen von 10- und 40-facher Vergrößerung beurteilt. Es wurden die histologische Qualität des Präparates, der Gehalt und die Strukturierung der vorhandenen Gewebe, die Ausdehnung der Mittelliniensuturfläche sowie zelluläre Elemente erfasst. Die qualitative Beschreibung erfolgte über das gesamte Präparat unter Berücksichtigung aller vorhandenen Schnitte. Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die Gewebsanteile quantitativ erfasst.

#### **4.6.3 Quantitative Beschreibung**

Um neben einer rein qualitativen Beschreibung der Gewebsstrukturen quantitative Aussagen bezüglich der Knochenresorption und Gewebeverteilung treffen zu können, wurden mit Hilfe histomorphometrischer Untersuchungen vergleichbare untersucherunabhängige Daten der Gewebestruktur erhoben.

Der Gewebeschnitt wurde mit der Mittelliniensutur im Zentrum des Gesichtsfeldes zentriert, da durch vorangegangene Arbeiten gezeigt worden war, dass die Hauptosteolysen im Bereich der Mittelliniensutur zu finden sind (Schwarz et al. 2000).

#### **4.6.4 Parameter der quantitativen Auswertung**

Die ermittelten histomorphometrischen Daten wurden entsprechend der internationalen Klassifikation von Parfitt et al. 1987 angegeben mit Ausnahme der Mittelliniensuturfläche, die nach Schwarz et al. 2000 angegeben wurde. Folgend werden die verwendeten Parameter sowie die Abkürzungen erläutert:

##### *Mittelliniensuturfläche*

Die Mittelliniensuturfläche gilt als Indikator für die osteolytische Aktivität. In 10-facher Vergrößerung wurde die nicht mit Knochengewebe gefüllte Mittelliniensuturfläche im

Zentrum des Gesichtfeldes zentriert und diese Fläche ausgemessen. Durch die Resorption der Osteoklasten wurde diese Fläche vergrößert (Schwarz et al. 2000).

#### *Osteoklastenanzahl*

Die Anzahl der TRAP positiven Zellen wurde durch die Mehrkernigkeit und durch die Anfärbung des Zytoplasmas der Osteoklasten ermittelt. Die Osteoklasten wurden in einem Gesichtsfeld bei 20-facher Vergrößerung gezählt.

#### *Gewebeverteilung in %*

Die Gewebeverteilung beschreibt die histologische Struktur der Knochenschnitte und gibt eine prozentuale Angabe über die vorliegenden Gewebearten.

Untersucht wurden die vorherrschenden Gewebearten (Gesamtknochengewebe, Osteoid, Gesamtknochengewebe minus Osteoid, Osteolysen, Markraum und Mittelliniensuturfläche). Die Flächenanteile jeder Einzelmessung wurden als Prozentanteil der Gesamtmessfeldfläche, d.h. die Mittelliniensutur wurde in 10-facher Vergrößerung zentriert und dieses Gesichtsfeld wurde vermessen, angegeben.

#### *Gesamtgewebe (Tissue Area ( T.Ar.))*

Das Gesamtgewebe wurde in 10-facher Vergrößerung vermessen. Es beinhaltet die Fläche des Knochengewebes sowie den Markraum und die Fläche der Mittelliniensutur und Umfangsparameter.

T.Ar. = Tissue area (mm<sup>2</sup>): Messfeldfläche, bestehend aus Kortikalis, Spongiosa und Markraum

#### *Gesamtes Knochengewebe (Bone Area (B.Ar.))*

Das gesamte Knochengewebe beschreibt die Fläche des mineralisierten und osteoiden Knochengewebes in 10-facher Vergrößerung.

---

B.Ar. = Bone Area (mm<sup>2</sup>): Knochenfläche inklusive der nichtmineralisierten Anteile

#### *Gesamtes Knochengewebe in %*

Das Gesamtknochengewebe stellt eine wichtige Komponente zur Bestimmung der osteolytischen Aktivität dar. Kompaktes Knochengewebe und osteoides Gewebe wurden addiert und relativ zum Gesamtgewebe dargestellt.

#### *Knochenneubildung*

Die Knochenneubildung beschreibt die Fläche links und rechts der Mittelliniensutur an osteoiden Gewebe im Präparat. Hier wurde ebenfalls in 10-facher Vergrößerung die Mittelliniensutur zentriert und diesem Gesichtsfeld das osteoide Gewebe vermessen.

#### *Kortikale Dicke*

Zur Bestimmung der kortikalen Dicke zwischen äußerem und innerem Periost diente ein Maßstabgitter, das durch die Mittelliniensutur gelegt wurde und hier die Bezeichnung 0 mm erhielt. Gemessen wurde in sukzessiven 0,5 mm Abständen, d.h. nach links negativ -0,5 mm; -1,0 mm; -1,5 mm; -2 mm und rechts von der Mittelliniensutur positiv 0,5 mm; 1,0 mm; 1,5 mm; 2 mm. Die Messungen wurden in 10-facher Vergrößerung vorgenommen.

### **4.7 Statistik**

Die histomorphometrisch erhobenen Daten wurden zur weiteren Analyse in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 (Firma Microsoft, New York, USA) eingegeben.

Zur Beschreibung der ermittelten Parameter wurde für jede oben genannte Untersuchungsgruppe der Mittelwert sowie als robustes Streuungsmaß die Standardabweichung angegeben.

Beim Vorliegen signifikanter Verteilungsunterschiede getestet mit one-way ANOVA (analysis of variance between groups) wurde ein Gruppenvergleich zwischen den Untersuchungsgruppen mit dem Student-t-Test vorgenommen und das Signifikanzniveau ermittelt.

Für die Signifikanzangaben wurden folgende Werte verwendet:

<u>p- Wert:</u>	<u>Signifikanzniveau</u>	<u>Abkürzung</u>
$p > 0,05$	nicht signifikant	n.s.
$p < 0,05$	signifikant	*
$p = 0,01$	hoch signifikant	**

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Tägliche postoperative Visiten**

Postoperativ stellten sich keine Wundheilungsstörungen ein. Die Wunden zeigten sich während der täglichen Kontrollen reizlos. Die Augen waren gut befeuchtet und zeigten ebenfalls keine Infektionszeichen. Die Einstichstelle zur Applikation der Zoledronsäure zeigte keine lokale Reaktion. Die Tiere nahmen ihr Futter und Wasser gut auf und präsentierten sich in einem guten Allgemein- und Ernährungszustand. Keine Gewichtsabnahme wurde beobachtet. Die Fäden wurden über die Versuchszeit in situ belassen, um die Tiere möglichst wenig durch Stress zu belasten.

Alle Tiere überlebten die 14-tägige Versuchsdauer und wurden am 14. postoperativen Tag in der Kohlendioxid-Kammer euthanasiert.

### **5.2 Makroskopische Beurteilung der Schädelkalotten**

Die Kalotten der Gruppe I zeigten keine Veränderungen. Granulationsgewebe wurde nur wenig gebildet. Das Kopffell war gut gegenüber dem Knochen verschiebbar.

Der Kalotte lag in Gruppe II aber auch in Gruppe III und IV ein fibröses und narbiges Granulationsgewebe auf. Vielfach war das Fell nicht mehr gegenüber der Unterlage verschiebbar. Die Wunde war gut verheilt und zeigte keine Infektionszeichen.

### **5.3 Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte**

Die Gewebestruktur der nicht dekalzifizierten Knochenschnitte stellte sich wie folgt dar. In unterschiedlicher Ausprägung je nach Gruppe fand man solides Bindegewebe, Granulationsgewebe und kompaktes Knochengewebe als Hauptkomponenten. Als weitere Gewebearten fanden sich blutbildendes Knochenmark, Gefäßendothelien und Periost. Das Bindegewebe stellte sich als gerichtete Struktur in der Mittelliniensutur und der Knochen als typischer desmoider Knochen mit Osteozyten und umgebendem Periost dar. Desmoide Ossifikation wurde beobachtet. Viele Polyethylenpartikel wurden in den Makrophagen und

Riesenzellen aufgefunden und die zellulären Reaktionen der Makrophagen und der ortsständigen Osteoklasten äußerten sich durch substantiellen Knochenabbau.

### *Gruppe I*

Die Oberfläche des Knochens stellte sich als regelmäßige konkave Fläche dar. Die Knochenmatrix zeigte sich als homogene Struktur über die Schnittfläche bei gerichteter Strukturierung der Kollagenfibrillen. Der Schädelknochen wurde von einer dünnen Periostschicht überzogen, die sich in den Präparaten als intakte Struktur darstellte. Es waren nur sehr wenige Substanzverluste an der konvexen Seite des Schädelknochens zu erkennen. Osteozyten waren in den mit Giemsa gefärbten Präparaten nachweisbar und ringsum mit Knochengrundsubstanz umgeben.

Die Mittelliniensutur zeigte einen gerichteten Verlauf der Kollagenfasern und war zellreich. Eine Vergrößerung der Sutura war nur auf vereinzelt Präparaten nachzuweisen. Auf den Anschnitten zeigte sich zellreiches blutbildendes Knochenmark aller Blutbildungsreihen. Ein Granulationsgewebe war nur vereinzelt über der Mittelliniensutura zu finden.

### *Gruppe II*

Der Knochen der Gruppe II zeigte alle Elemente der osteolytischen Aktivität der Osteoklasten. Das Periost war nicht intakt, besonders über der Mittelliniensutura zeigte sich in den Präparaten eine Konturunterbrechung. Hauptsächlich stellte sich die Osteolyse an der konvexen Seite des Schädelknochens dar. Die Oberfläche erschien unruhig und zeigte rein qualitativ verglichen zu Gruppe I, III und IV einen deutlichen Substanzverlust über der Mittelliniensutura. Die Lakunen stellten sich morphologisch als zapfenartige Ausstülpungen dar. Vielfach war es zu einer Kontinuität zwischen den Markräumen beiderseits der Mittelliniensutura und dem Bindegewebe der Suturafläche gekommen. Der Knochen wurde durch Bindegewebe ersetzt. Dieses Bindegewebe wies eine von dem suturaflächenfüllenden Bindegewebe verschiedene Strukturierung auf. Der Verlauf der neugebildeten Kollagenfibrillen zeigte sich nicht so gerichtet wie der des soliden Mittelliniensutura Bindegewebes. In den Osteolysezonen hatten sich diverse Immunzellen

(Lymphozyten, Makrophagen und Osteoklasten) pallisadenartig um den Knochen formiert. Auch waren in einigen Präparaten osteolytische Aktivitäten innerhalb der Knochenmatrix zu erkennen, der Knochen wies auch hier alle oben beschriebenen Charakteristika auf.

Das Granulationsgewebe hatte eine größere Fläche und war zellreicher (Immunozyten und Fibroblasten) als bei den anderen Gruppen.

Eine Vielzahl von Osteoklasten war in einem Gesichtsfeld auszumachen.

### *Gruppe III*

Der Knochen der Gruppe III stellte sich morphologisch als solides Gewebe dar. Das Periost war weitgehend über die gesamte Präparatlänge erhalten. Der Knochen zeigte hin und wieder osteolytische Zonen, die sich aber in Größe und Form deutlich von Gruppe II unterschieden. Diese Zonen enthielten ebenfalls die oben genannten mikroskopischen Charakteristika der Osteolyse. Deutlich zu erkennen war ein Nettogewinn an mineralisierter Knochensubstanz. Der Knochen gestaltete sich über das Präparat gesehen dicker. Das Osteoid bildete sich zu beiden Seiten der Mittelliniensutur und zeigte seine maximale Dicke auf halber Strecke zwischen Mittelliniensutur und parietaler Sutur. Das neugebildete Knochengewebe stellte sich als aufgelockerte mit dem Knochen vielfach verzahnte Struktur dar. Insel- und schollenartig, in einige Präparaten schon annähernd kompaktes Knochengewebe, lagerte sich das eosinophile Gewebe dem nativen Schädelknochen auf. Eine Vielzahl von Osteozyten, Osteoblasten, Erythrozyten, Zellen der weißen Blutzellreihe und Endothelien durchzogen dieses Gewebe. Tatreresistente saure Phosphatase positive Zellen waren in diesem Gewebe nur selten vertreten. Dieser Stabilitätswachst stellte sich schon während der histologischen Aufbereitung der Kalotten dar.

Die Markräume waren mit zahlreichen Immunzellen gefüllt, zeigten aber keine Verbindung zur Suturfläche bzw. zum peripheren Bindegewebe. Im Knochengewebe konnten zahlreiche Osteozyten mit umgebender Knochensubstanz gefunden werden.

Auch die Anzahl der Tatreresistenten saure Phosphatase positiven Zellen war deutlich verschieden zu Gruppe II.

### *Gruppe IV*

Die Morphologie des Knochens in Gruppe IV stellte sich ähnlich der Gruppe III dar. Das auch hier vorhandene osteoide Gewebe wirkte hingegen ein wenig aufgelockerter als in Gruppe III. Die schollenartigen Ausstülpungen verbanden sich erst langsam zu einer Grenzschicht, die in Gruppe III vielfach schon vorhanden war. Der Knochen zeigte rein qualitativ in Zusammensetzung der zellulären Bestandteile und der Dicke des Knochens keinen Unterschied zu Gruppe III. Auch die Osteoklastenzahl war unwesentlich verschieden zu Gruppe III.

## **5.4 Quantitative histologische Analyse der Knochenschnitte**

### **5.4.1 Mittelliniensuturfläche**

Die Gruppenauswertung der Messwerte für die Mittelliniensuturfläche nach 14-tägiger Versuchszeit zeigte die nachfolgend beschriebene Verteilung (siehe Diagramm 1).

Der Mittelwert aus der Kontrollgruppe (Gruppe I) lag bei  $0,04 \text{ mm}^2$ . Die Messwerte zeigten bei einer Standardabweichung von  $0,01$  nur eine geringe Streuung. Der minimale Wert der Mittelliniensuturfläche lag bei  $0,03 \text{ mm}^2$  und der maximale Wert bei  $0,06 \text{ mm}^2$ .

Die Gruppe der operierten mit Polyethylenpartikel versehenen Mäuse (Gruppe II) zeigte für den Mittelwert dieser Fläche einen um den Faktor  $6,5$  größeren Wert ( $0,26 \text{ mm}^2$ ). Die Schwankungsbreite dieser Messwerte lag höher als in Gruppe I. In der Gruppe II betrug die Standardabweichung  $0,08$  mit einem minimalen Wert von  $0,13 \text{ mm}^2$  und einem maximalen Wert von  $0,40 \text{ mm}^2$ .

Die am Operationstag Tag mit Zometa® Zoledronat behandelten Mäuse (Gruppe III) zeigten bedingt durch die Polyethylenpartikel stimulierten Osteoklasten einen deutlichen Unterschied bezüglich der Mittelliniensuturfläche als Indikator der osteolytischen Aktivität. Der Mittelwert dieser Gruppe betrug  $0,14 \text{ mm}^2$  mit einer Standardabweichung von  $0,03$ . Somit zeigten die Werte hier eine geringe Streuung mit einem minimalen Wert



von  $0,11 \text{ mm}^2$  und einem maximalen Wert von  $0,20 \text{ mm}^2$ . Dieses bedeutete verglichen mit der Fläche der Gruppe II eine Reduktion des Wertes um 46 % bzw. um den Faktor 1,5.

In Gruppe IV, die mit Zometa® am 4. postoperativen Tag behandelten Mäuse, lag der Mittelwert bei  $0,14 \text{ mm}^2$ , ähnlich dem Wert aus Gruppe III. Die Messwerte unterlagen in dieser Gruppe nur einer geringen Streuung mit einer Standardabweichung von  $0,03$ . Dieses stellte sich auch im Minimum von  $0,1 \text{ mm}^2$  und einem Maximum von  $0,19 \text{ mm}^2$  dar.

Die Statistik zeigte mit  $p = 0,013$  \* einen signifikanten Unterschied der Messwerte zwischen Gruppe I und II. Zwischen den Messwerten aus Gruppe II und Gruppe III bestand wiederum ein hochsignifikantes Ergebnis mit  $p = 0,0045$  \*\* ebenfalls zwischen den Gruppen II und IV mit  $p = 0,0060$  \*\*.

Zwischen den Gruppen III und IV, bei denen die Zometa® - Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte, bestand mit  $p = 0,47$  n.s. kein statistisch signifikanter Unterschied.

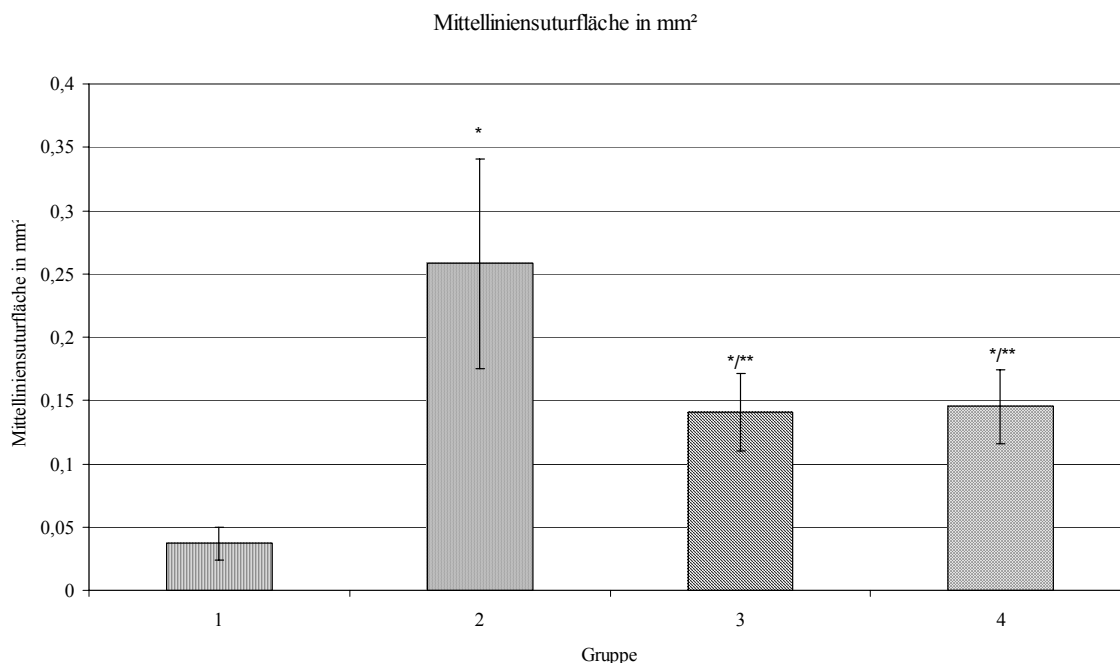


Diagramm 1: Mittelliniensuturfläche in  $\text{mm}^2$

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

#### 5.4.2 Osteoklastenanzahl / TRAP positive Zellen

Vornehmlich wurden die TRAP positiven Zellen in den Osteolyse-Zonen der Mittelliniensutur gefunden, aber auch in den Lakunen im Grenzbereich von Periost zu kompakter Knochensubstanz sowie im Granulationsgewebe.

In Gruppe I wurden in einem Gesichtsfeld 8,68 TRAP positive Zellen gefunden. Der Streubereich lag zwischen einem Minimum von 6,17 und einem Maximum von 10,83 TRAP positiven Zellen mit einer Standardabweichung von 2,04. (siehe Diagramm 6)

Gruppe II präsentierte in einem Gesichtsfeld im Durchschnitt 20,14 TRAP positive Zellen. Maximal konnten 25,5 TRAP positive Zellen gezählt werden, minimal 17,13 Zellen. Die Standardabweichung betrug in dieser Gruppe 2,81.

Gruppe III zeigte hingegen eine deutliche Reduktion der TRAP positiven Zellen. Die Anzahl an TRAP positiven Zellen näherte sich in Gruppe I mit durchschnittlich 9,20 Zellen pro Gesichtsfeld, mit einer Spannbreite von minimal 7,63 bis maximal 12,75 TRAP positiven Zellen und einer Standardabweichung von 1,75.

Gruppe IV zeigte wiederum ähnlich konstante Werte wie Gruppe III. Wir zählten 10,15 TRAP positive Zellen pro Gesichtsfeld und einen Streubereich von minimal 9 TRAP positiven Zellen bis hin zu maximal 11,17 TRAP positiven Zellen mit einer Standardabweichung von 0,84.

Somit konnte der Unterschied zu einem hochsignifikantes Ergebnis zwischen den Gruppen II und III mit  $p = 0,00011$  \*\* sowie zwischen den Gruppen II und IV mit  $p = 0,00043$  \*\* als auch zwischen Gruppe I und Gruppe II mit  $p = 0,00060$  \*\* führen. Wiederrum zeigte sich Gruppe III gegenüber Gruppe IV als nicht signifikant verschieden. Kein signifikantes Ergebnis ergab der Student-t-Test zwischen den Gruppen I und III  $p = 0,28$  n.s., zwischen den Gruppen I und IV  $p = 0,075$  n.s. und zwischen den Gruppen III und IV  $p = 0,13$  n.s. .

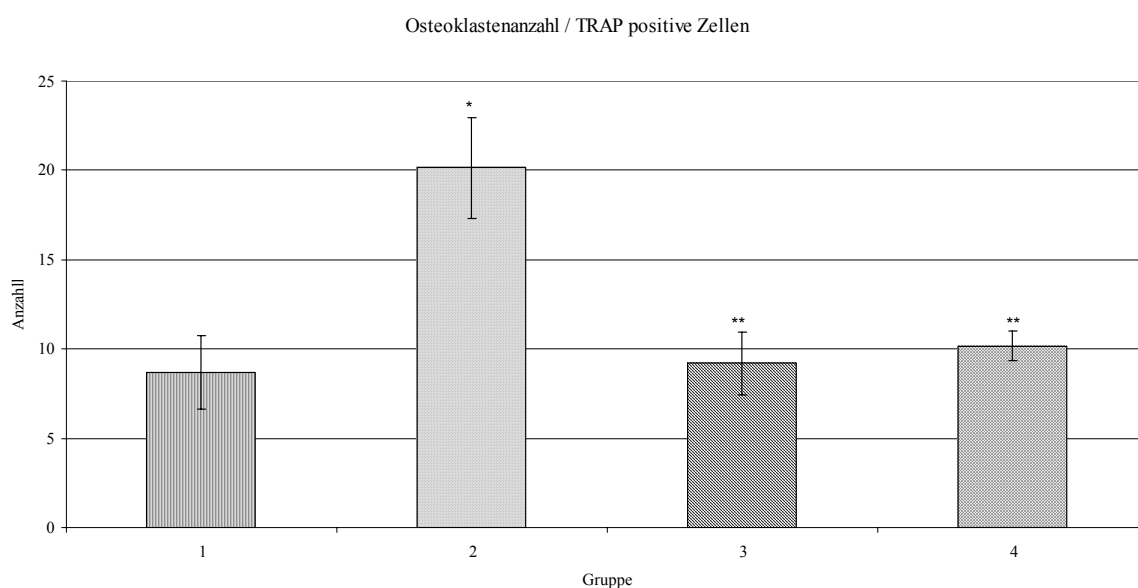


Diagramm 2: Osteoklastenzahl / TRAP positive Zellen

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

### 5.4.3 Gewebeverteilung

Mittels der Auswertung der Gewebeverteilung ließ sich der Anteil der Hauptgewebearten (Knochen absolut minus Osteoid, Osteoid, Mittelliniensutur, Osteolysen, Markraum) darstellen. (siehe Diagramm 4)

Gezeigt wurde, dass der Markraum in allen Gruppen zwischen 10 % und 14 % ausmachte und somit keiner großen Streuung unterlag.

Gruppe I zeigte einen absoluten Knochenanteil von 83,78 % des gesamten Präparatgewebes, die Mittelliniensuturfläche hatte einen Prozentanteil von 3,37 %, Osteolysen machten 0,50 % aus und der Markraum beinhaltete 12,45 % der Gesamtmessfeldfläche.

In Gruppe II war ein deutlicher Substanzverlust an Knochenmasse zu verzeichnen. Die Knochenmasse lag hierbei bei 71,69 % im Mittelwert. Auch der Anteil an Bindegewebe

repräsentiert durch die Mittelliniensuturfläche 16,47 % und die Osteolyseflächen von 1,92 % grenzten diese Gruppe gegenüber den übrigen Gruppen I, III und IV ab. Der Osteoidanteil lag bei 0,71 %. Der Markraum war gegenüber Gruppe I wenig geringer ausgeprägt, er entsprach 9,88 % des gesamten Gewebes.

Die untersuchten Präparate der Gruppe III und IV zeigten keine großen Unterschiede, grenzten sich aber gegen Gruppe I bezüglich des osteoiden Gewebes und gegen Gruppe II aufgrund der Mittelliniensuturfläche ab. So war der Anteil des kompakten Knochengewebes gegenüber Gruppe I geringer ausgeprägt. Der relative Knochenanteil betrug in Gruppe III 81,08 % und in Gruppe IV 79,44 %. Das osteoide Gewebe machte einen Anteil von 9,46 % in Gruppe III und in Gruppe IV von 7,54 % aus. Die Werte der Mittelliniensuturfläche beliefen sich in Gruppe III auf 6,07 % und in Gruppe IV auf 6,48 %. Osteolysen auf der konvexen Seite des Schädelknochens waren aufgrund der Knochenneubildung nur wenig ausgeprägt, sie beliefen sich in Gruppe III auf 0,02 % und in Gruppe IV auf 0,0 %. Der Markraum war vergleichbar groß zu Gruppe I. Er betrug in Gruppe III 12,21 % und in Gruppe IV 14,06 %.

Die prozentuale Gewebeverteilung zeigte eine einheitliche Verteilung der Markräume und des Knochengewebes an, so dass eine Vergleichbarkeit der Werte sicher gestellt war.

Aus der Gesamtverteilung wurden die Werte des gesamten Knochenvolumens zur Darstellung des Verlustes des Knochens durch Knochenresorption einzeln dargestellt.

Der Knochenanteil in Gruppe I betrug 83,77 %, 12 % mehr als in Gruppe II (71,87 %). Gruppe III wies einen Knochenanteil von 81,13 % auf und Gruppe IV 79,42 %.

Der Student-t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe I und II mit  $p = 0,00025$  \*\*. Ebenfalls signifikant verschieden war der Test zwischen Gruppe II und III mit  $p = 0,0012$  \*\* und zwischen II und IV mit  $p = 0,0036$  \*\*. Der Vergleich zwischen Gruppe III und Gruppe IV war nicht signifikant verschieden  $p = 0,17$  n.s..

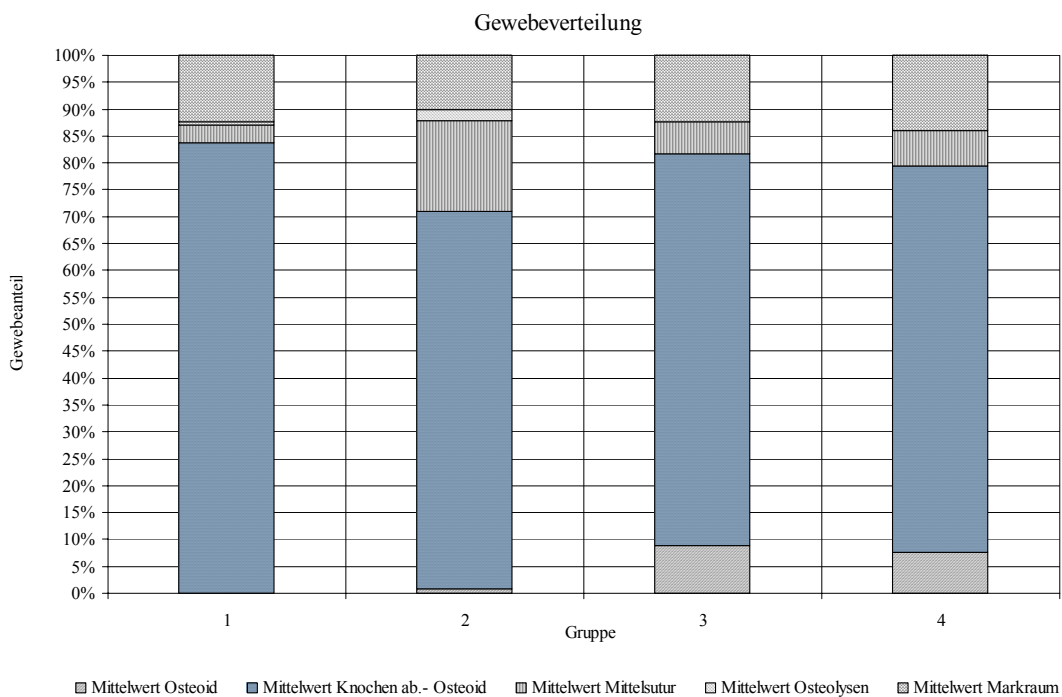


Diagramm 3: Gewebeverteilung in %

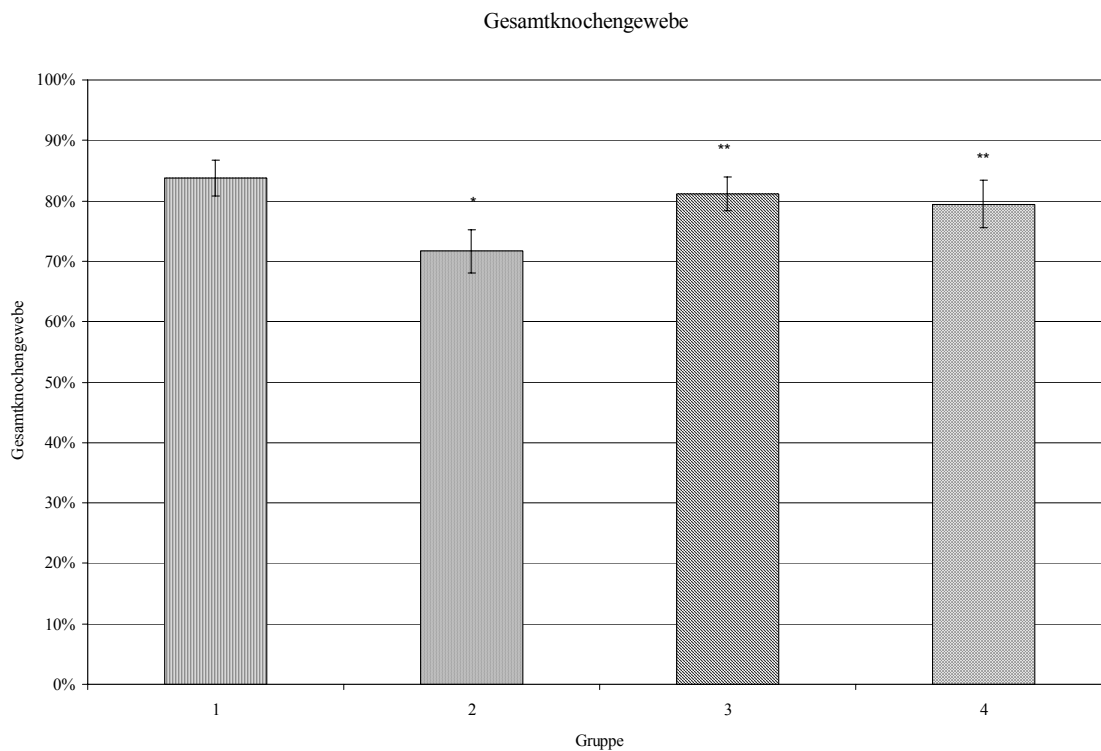


Diagramm 4: Gesamtes Knochengewebe in %

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

#### 5.4.4 Knochenneubildung

Der absolute neugebildete Osteoidknochen unterstrich die gewonnenen Ergebnisse in der Knochendickebestimmung.

In Gruppe I wurde in keinem Präparat neugebildeter Knochen (Osteoid) gefunden.

In Gruppe II zeigten zwei Präparate eine Knochenneubildung. Links der Mittelliniensutur  $0,13 \text{ mm}^2$  bzw.  $0,14 \text{ mm}^2$  und rechts der Mittelliniensutur  $0,06 \text{ mm}^2$  bzw.  $0,07 \text{ mm}^2$ . Der Mittelwert der gesamten Knochenneubildung bezogen auf die 7 Tiere dieser Gruppe betrug  $0,03 \text{ mm}^2$ .

Anders gestaltete sich die Knochenneubildung in Gruppe III und IV. In Gruppe III variierten die Werte zwischen dem Minimum von  $0,14 \text{ mm}^2$  und einem Maximum von  $0,35 \text{ mm}^2$  an neugebildeter Knochensubstanz. Im Mittelwert lag die Knochenneubildung bei  $0,25 \text{ mm}^2$  mit einer Standardabweichung von  $0,08$ .

Die Knochenneubildung der Gruppe IV zeigte ebenfalls einen deutlichen Substanzgewinn an. Auch hier variierten die Werte zwischen  $0,07 \text{ mm}^2$  und  $0,36 \text{ mm}^2$ . Der Knochen hatte im Durchschnitt  $0,21 \text{ mm}^2$  mit einer Standardabweichung von  $0,11$  an Fläche zugenommen.

Auch in dieser Untersuchung zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zu Gruppe II. Mit dem p-Wert  $p = 0,00018$  \*\* zwischen Gruppe II und III und dem p-Wert  $p = 0,0042$  \*\* zwischen Gruppe II und IV wurde das Ergebnis der Knochendickenbestimmung untermauert und stellte ein hochsignifikantes Ergebnis dar. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Gruppe III und IV  $p=0,17$  n.s..

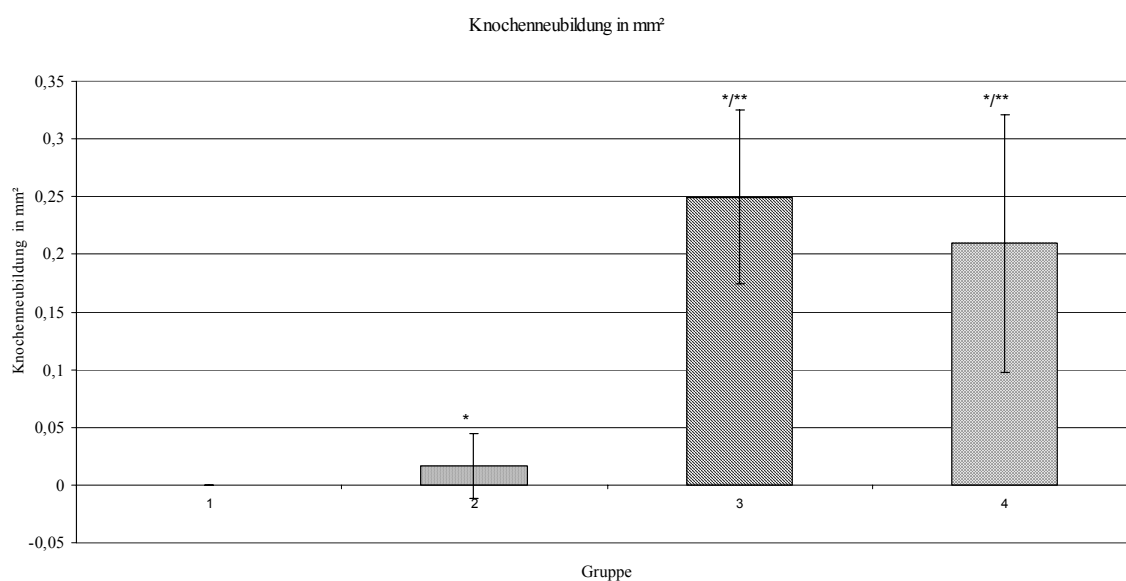


Diagramm 5: Knochenneubildung in mm<sup>2</sup>

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

#### 5.4.5 Die Knochendicke

Die Knochendicke als Indikator für die Knochenneubildung zeigte für die Gruppen III und IV einen deutlichen Zuwachs des Knochendurchmessers an 9 sukzessiven Messpunkten im Abstand von 0,5 mm gemessen von der Mittelliniensutur der Präparate. Der Knochen der Gruppe II stellte die geringste Knochendicke im Gesamtverlauf der Präparate dar (siehe Diagramm 2).

Der größte Wert in Gruppe I wie auch in den übrigen Gruppen zeigte sich am Knochen direkt anliegend an der Mittelliniensutur. An der Mittelliniensutur betrug die Knochendicke durchschnittlich 0,31 mm. Der Knochen dünnte in seinem Verlauf von der Mittelliniensutur bis zur parietalen Suture bis zur halben Strecke auf Werte von 0,17 mm aus, um dann wieder an Knochendicke zuzunehmen (0,18 mm). Dieser Verlauf der Knochendicke gemessen an den definierten Messpunkten war bei allen Gruppen festzumachen. In Gruppe I war der Knochen im Mittelwert 0,20 mm dick.

Der Knochen der Gruppe II (0,16 mm) war im Mittelwert 0,04 mm dünner als in Gruppe I. Auch hier lag der höchste Wert in Höhe der Mittelliniensutur mit 0,18 mm. Der Knochen

flachte wiederum zur Parietalsutur ab und lag mit seinem niedrigsten Wert bei Meßpunkt -1,00 mm bei 0,14 mm Knochendicke. Durchschnittlich war der Knochen 0,16 mm dick.

Gruppe III zeigte den höchsten Nettogewinn an Knochensubstanz. Wiederum in Höhe der Mittelliniensutur manifestierte sich der höchste Wert. Die Knochendicke betrug hier 0,39 mm. Verglichen mit Gruppe II handelte es sich um einen Zuwachs der Knochensubstanzdicke um 58,9 %. Auch gegenüber Gruppe I stellte sich ein Unterschied von 23,1 % mehr Knochensubstanz ein. Deutlich wurde der Substanzgewinn durch die Werte gemessen bei Messpunkt -1,00 mm hier stellte sich ein Unterschied von 38 % mehr Nettoknochensubstanz gegenüber Gruppe I ein. Im Mittel war der Knochen 0,31 mm dick.

Der Knochen der Gruppe IV zeigte eine ähnliche Verteilung wie in Gruppe III. Allerdings waren die Werte um die Mittelliniensutur gegenüber Gruppe III ein wenig niedriger. Hier stellte sich eine durchschnittliche Knochendicke von 0,34 mm ein. Zur parietalen Sutur war kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Zometa® behandelten Mäusen festzustellen. Der Knochen zeigte auch in dieser Gruppe seinen typischen Verlauf.

Der statistische Vergleich zeigte einen hochsignifikanten Unterschied mit  $p = 0,00042$  \*\* zwischen den Gruppen II und III bzw.  $p = 0,0019$  \*\* zwischen den Gruppen II und IV. Ein signifikantes Ergebnis wurde zwischen Gruppe I und III und zwischen den Gruppen I und IV mit Ausnahme der Mittelliniensutur (0 mm) an jedem Messwert erzielt. Nicht signifikant verschieden zeigte sich der Vergleich der Gruppen III und IV  $p = 0,07$  n.s. an der Mittelliniensutur (0 mm).



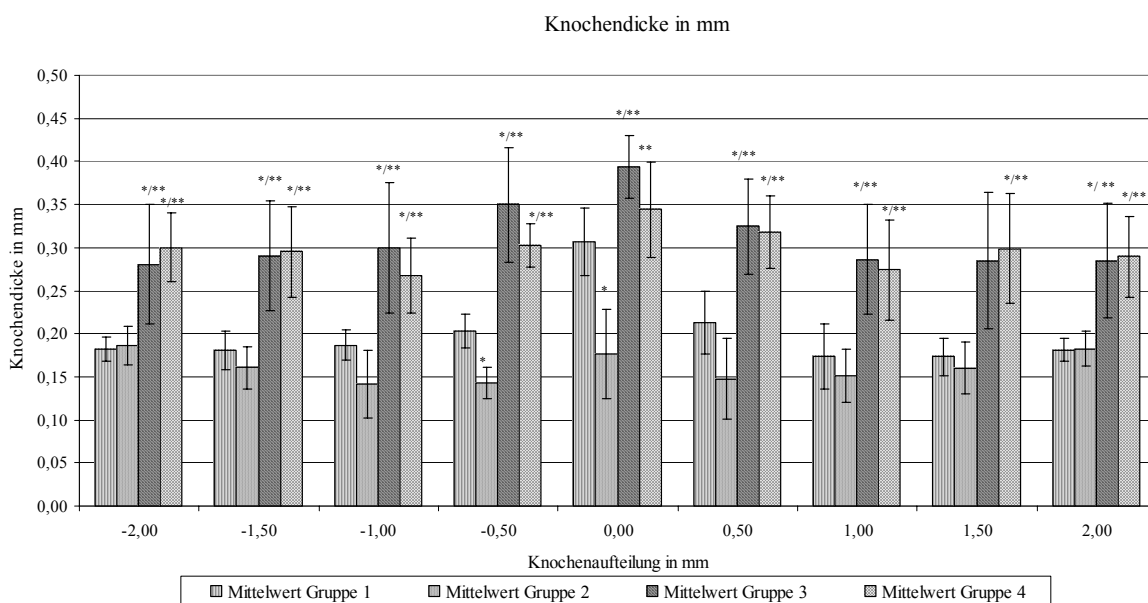


Diagramm 6: Knochendicke in mm

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

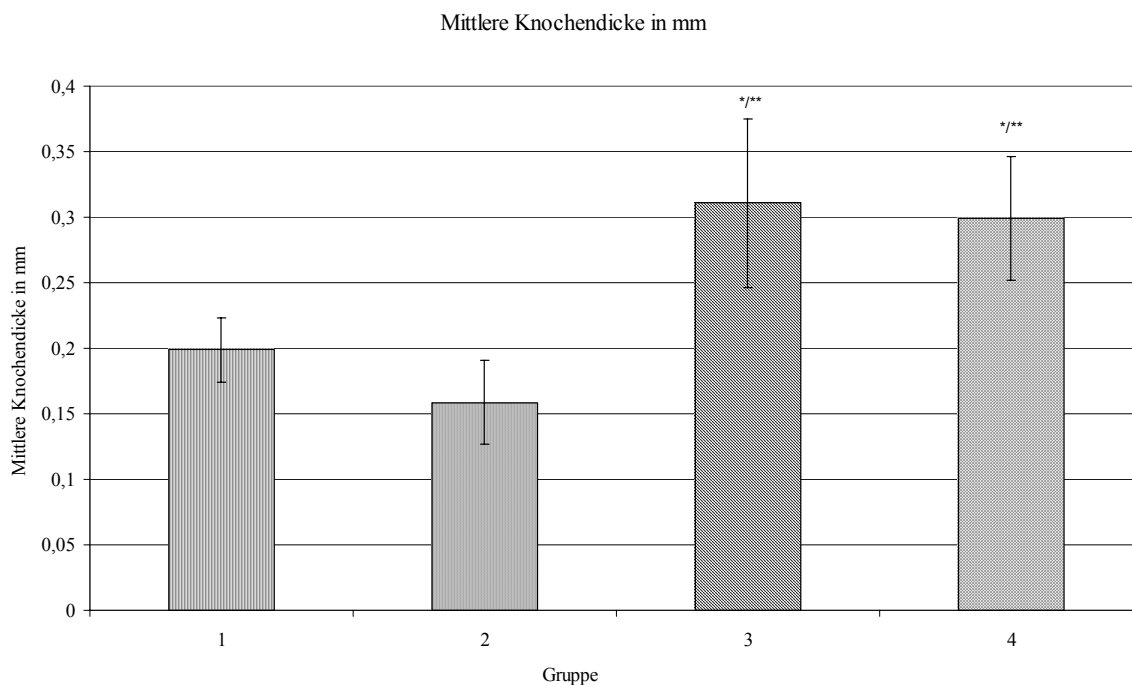


Diagramm 7: Mittlere Knochendicke in mm

[mean +/- Standardfehler; \*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 1; \*\*= $p < 0,05$  gegenüber Gruppe 2]

## **6 Diskussion**

### **6.1 Versuchsaufbau**

Die partikelbedingte periprothetische Osteolyse nach Prothesenimplantationen und die anschließende Lockerung der Endoprothese bleiben ein ernsthaftes Problem. Die periprothetische Osteolyse wird heute als ein Hauptgrund der aseptischen Prothesenlockerung angesehen. Wir konnten unterstützend durch die Entwicklung eines quantitativen Modells mit Kleintieren die experimentelle Überprüfung und Testung des Bisphosphonates Zometa® Zoledronat erreichen.

Ebenfalls konnten wir mit unserem Modell experimentell Polyethylenpartikel-bedingte Osteolysen erzeugen. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Schwarz et al. 2000 in ihrem Kleintiermodell mit Titanpartikeln.

Unsere Überlegungen zur Implantation von Polyethylenpartikeln anstelle von Titanpartikeln werden im Folgenden erläutert.

### **6.2 Modell**

#### *Partikelsorten*

Heutzutage werden am häufigsten totale Hüftprothesen eingesetzt, die aus einem Metallkopf bestehen und mit einer Pfanne aus Polyethylen artikulieren. Obwohl andere Systeme in den letzten 30 Jahren untersucht worden sind, wie z.B. Metall auf Metallprothesen oder Keramik-Keramik Total Endoprothesen, haben sich die Metall auf Polyethylen Prothesen etabliert und sind heutzutage zum Standard der prothetischen Versorgung degenerativer Gelenkserkrankungen geworden (Kurtz et al. 1999). Es zeigte sich, dass die Polyethylenpartikel einen prozentualen Anteil von 70 bis 90 % an den Gesamtpartikeln im periprothetischen Gewebe haben (Shanbag et al. 1994, Maloney et al. 1995). Daher lag der Verdacht nahe, dass die Polyethylen - Partikel auch ein oder der hauptsächliche Induktor für die um die Prothese lokalisierte Osteolyse sind.

Eine Aussage über die osteolytische Potenz der einzelnen Partikel zu machen, bleibt dennoch schwierig. Die Zellen, die an der osteolytischen Kaskade beteiligt sind, reagieren

unterschiedlich auf die Verschleißpartikel der verschiedenen Werkstoffe. Dieses Verhalten ist abhängig von der Größe, Zusammensetzung der Partikel und ihrer Konzentration im Gewebe. Dennoch wird den Polyethylen-Partikeln eine Hauptrolle zugeschrieben (Schmalzried et al. 1992, Jacobs et al. 2001).

So demonstrierte eine Studie, die von Kwon et al. 2000 veröffentlicht wurde, dass die Polyethylenpartikel im Vergleich zu anderen Partikeln eine größere osteolytische Potenz zeigten. In dieser Studie wurden untereinander nicht kommerziell erhältliche Titanpartikel, Polymethylmethacrylatpartikel und Polyethylenpartikel verglichen (Kwon et al. 2000).

In der Studie von Kwon et al. 2000 wurden die Polyethylenpartikel durch den Hüftgelenkssimulator durch ein aufwändiges und kostenintensives Verfahren extra hergestellt. Die Verfügbarkeit der in dieser Art und Weise hergestellten Polyethylen-Partikel war limitiert und somit auch die Durchführbarkeit des polyethylenpartikelbasierten Modells. Aufgrund dessen haben wir die kommerziell erhältlichen Ceridust®-Partikel der Firma Clariant verwendet.

Wir glauben, dass Titanpartikel nicht der heutigen klinischen Bedeutung gerecht werden.

Es sind zwar Titanpartikel im periprothetischen Gewebe gefunden worden (Willert et al. 1997), aber es stellte sich heraus, dass diese Titanpartikel nur bei bestimmten Implantat-Typen für die aseptische Prothesenlockerung verantwortlich waren. Diese Endoprothesensysteme werden jedoch heutzutage nicht mehr eingesetzt.

Deshalb schlagen wir den Einsatz im Osteolysemodell von Ceridust®-Polyethylenpartikel der Firma Clariant gegenüber Titanpartikeln vor.

### *Partikelgröße*

Experimentelle Untersuchungen zur Problematik der partikelinduzierten Osteolysen sollten Partikelsorten verwenden, welche von der Größenverteilung her einen hohen Anteil an kleinen Partikeln aufwiesen.

Benz und Mitarbeiter fanden in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von bei Wechseloperationen gewonnenen Geweben Partikel mit Größen zwischen 0,5  $\mu\text{m}$  und 250  $\mu\text{m}$  (Benz et al. 2001). Die Länge von Partikeln innerhalb von Makrophagen lag zwischen 0,4 und 1,0  $\mu\text{m}$ . In einer lichtmikroskopischen Studie war die Schnittfläche der in einkernigen Makrophagen liegenden Partikel mit  $2,34 \mu\text{m}^2 \pm 3,2 \mu\text{m}^2$  bestimmt worden

(von Knoch et al. 2000). Partikel, die kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind, können in der Regel lichtmikroskopisch gar nicht oder nur schwer erkannt werden. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Partikel, die kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind, eine stärkere osteolytische Reaktion erzeugen können als Partikel, die größer als 1  $\mu\text{m}$  sind (Green et al. 2000). Daher sollten Partikel, welche für in-vitro oder in-vivo Versuche verwendet werden, idealerweise einen gewissen Anteil ihrer Größenhäufigkeitsverteilung im Bereich unter 1  $\mu\text{m}$  aufweisen. Sprecher et al. 2001 vom AO-Forschungsinstitut, Davos, Schweiz konnten mit ihrem Algorithmus zeigen, dass mehr als ein Drittel der von uns verwendeten Ceridust®-Partikel sowohl die Größe von 1  $\mu\text{m}$  aufzeigten als auch nahe der in-vivo Größenverteilung lagen. Daher waren die Partikel eine kosten- und zeitgünstige Alternative gegenüber den Partikeln, die aufwendig mit dem Hüftsimulator hergestellt worden waren.

### *Endotoxin*

Unsere Methode setzte weiterhin voraus, dass das inflammatorische Gewebe in den Gebieten der Knochenresorption sowohl eine direkte Reaktion auf die Abriebpartikel und somit nicht auf eine eventuelle bakterielle Kontamination war als auch, dass diese Fläche des inflammatorischen Gewebes direkt proportional zur Osteolyse war. Daher führten wir einen Limulus Amoebocytin Assay durch, um eine eventuelle Kontamination mit Bakterien bzw. deren Endotoxinen auszuschließen und somit die direkte Reaktion des Gewebes auf die Polyethylen-Partikel in Form der Knochenresorption darstellen zu können.

### *Ergebnisse*

Durch die Anwendung unseres Modells fanden wir einen hochsignifikanten Unterschied bezüglich der Größe der Resorptionsflächen zwischen der Kontroll-Gruppe und der Polyethylenpartikel-implantierten Gruppe heraus. Der experimentelle Fehler innerhalb einer gleichbehandelten Gruppe war nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unser Modell genutzt werden kann, um den Effekt des hier verwendeten Zoledronats sowie möglicherweise andere Substanzgruppen auf die partikelinduzierte Osteolyse in vivo zu demonstrieren. Deshalb schlagen wir vor, dass das

hier gezeigte Polyethylenpartikel-induzierte Osteolysemodell als Ergänzung zum etablierten murinen in-vivo Modell mit Titanpartikeln dienen soll.

### **6.3 Versuchsdauer von 14 Tagen**

Wir wählten den Zeitraum von 14 Tagen für die Versuchsdauer aufgrund der Erkenntnisse von Schwarz et al. 2000 aus. Sie führten, um eine Reproduzierbarkeit ihrer quantitativen Methode zu gewährleisten, ein Verlaufsexperiment („time course Experiment“) durch. Den Mäusen wurden Titanpartikel auf ihre Calvaria implantiert und der jeweilige Knochen an am 1., 3., 5., 7., 10. und 14. Tag untersucht. Sie fanden einen stetigen Anstieg der Mittelliniensuturfläche als Manifestation der osteolytischen Aktivität bis zum 10. Tag postoperativ heraus. Die Osteoklastenzahl war ab dem 3. Tag gleichbleibend hoch. Diese Erkenntnisse veranlassten uns in der Annahme das Maximum der Osteolyse in diesem Zeitraum zu erreichen den Versuchszeitraum auf 14 Tage zu beschränken.

Unsere Ergebnisse zeigten einen statistisch hochsignifikanten Unterschied der Mittelliniensuturfläche, Knochendicke und Osteoklastenzahl zwischen den mit Zoledronat behandelten Tieren und den nicht Zoledronat behandelten Tieren.

### **6.4 Anzahl der Mäuse pro Gruppe**

Wir setzten 7 Tiere pro Gruppe ein und erhielten signifikante Ergebnisse in unseren Untersuchungen. Der Einsatz von sieben Versuchstieren pro Gruppe bietet daher ein gutes Leistungs-Nutzen-Prinzip und bietet darüber hinaus eine geringe Fehlertoleranz. Wir bestätigten mit unserer Untersuchung die Power Analyse des Departments of Biostatistics der Mayo Clinic in Rochester / Minnesota. Wir halten die Gruppengröße von sieben Tieren für weitere Untersuchungen für geeignet.

### **6.5 Einmalgabe von Zoledronat**

Wir überprüften die dritte Generation Bisphosphonate Zometa® Zoledronsäure. Die Zoledronsäure wurde generell gut durch die Mäuse toleriert. Es konnte in unserer Untersuchung gezeigt werden, dass in den mit Zoledronat behandelten Tieren die

Knochenresorption effektiv gehemmt wurde. Horowitz et al. 1996 und Rodan et al. 1996 zeigten, dass Alendronat ein spezifischer Inhibitor der Osteoklasten vermittelten Knochenresorption war.

In unserem Experiment verabreichten wir eine Einmalgabe Zoledronat subkutan und zeigten damit eine effektive Prävention der partikelinduzierten Osteolyse.

Eine einmalige Behandlung mit Zoledronat intravenös zeigte einen positiven Effekt in der Behandlung chronischer Erkrankungen (Reid et al. 2002). Reid et al. wiesen auf positive Effekte bezüglich der postmenopausalen Osteoporose hin und fanden heraus, dass eine jährliche Infusion an Bisphosphonaten eine Behandlungsoption sein kann.

In welcher Art und Weise eine einmalige Gabe von Zoledronat den Knochenabbau hemmt, ist nicht genau bekannt. Die verlängerte Suppression war nicht das Ergebnis des Wirkstoffes im Blutkreislauf. 24 Stunden nach Medikamentengabe betrug die Blutkonzentration des Zoledronats weniger als 1 Prozent und 40 Prozent der Dosis wurden mit dem Urin ausgeschieden. Vermutlich wurde ein Teil der Dosis am Knochengewebe gebunden und dann langsam wieder in den Blutkreislauf abgegeben, die Halbwertszeit betrug 167 Stunden im Plasma (Reid et al. 2002).

## **6.6. Auswertung**

### *Mittelliniensutur*

Die Mittelliniensuturfläche als Maß der Knochenresorption stellte sich in unserer Untersuchung hochsignifikant vergrößert gegenüber der Polyethylenpartikel-implantierten Gruppe als auch der mit Zoledronat behandelten Gruppen dar. Wir konnten durch die Auftragung der durchschnittlichen Knochendicke zeigen, dass die Hauptosteolyse sich im Bereich der Mittelliniensutur ereignete und damit ein zuverlässiges Maß der Knochenresorption darstellte. Unsere Methode zur Auftragung der Knochendicke in Diagrammform zeigte den typischen Verlauf der Knochendicke über das Präparat und demonstrierte die Unterscheide des Knochens in den einzelnen Gruppen. Schwarz et al. 2000 führten ebenfalls ihre Untersuchungen an dieser Leitstruktur durch. Wir halten daher die Mittelliniensutur für ein geeignetes Maß der Knochenresorption in diesem Modell.

### *Osteoklastenanzahl*

Wir zeigten eine deutliche Abnahme der Osteoklastenanzahl in den mit Zoledronat behandelten partikelimplantierten Gruppen. Selbst in der Gruppe, die erst am 4. postoperativen Tag Zoledronat subkutan erhielt, zeigte sich ein nicht signifikant verschiedenes Ergebnis gegenüber der sofort postoperativ mit Zoledronat behandelten Gruppe, wohl aber ein hochsignifikantes Ergebnis gegenüber der Partikelgruppe. Dieses spiegelte sich auch in der Größe der Mittelliniensuturfläche wider. Sowohl Gruppe III als auch Gruppe IV präsentierten eine ähnlich große Mittelliniensuturfläche sowie einen ähnlichen Verlauf der Knochendicke über die Länge des Querschnittes.

Schwarz et al. 2000 zeigten, dass die Anzahl der Osteoklasten in den Mäusecalvariae am Höhepunkt der osteolytischen Aktivität an den Tagen fünf bis zehn post Partikelimplantation ähnlich der Anzahl während der osteoblastischen Aktivität an den Tagen zehn bis vierzehn war. Evans et al. beschrieben 1994 weiter eine Inhibition der Osteoklastenreifung und der Rekrutierung von Osteoklasten an den Ort der Knochenresorption. Deshalb könnten die Effekte von Zoledronat in unserem Modell, d.h. einerseits die Verringerung der Anzahl an Osteoklasten andererseits die geringe Resorption des Knochens im Zusammenhang mit der Hemmung der Osteoklastogenese und der Rekrutierung der Osteoklasten, sowie der Hemmung der Aktivität der Osteoklasten als auch im Zelltod gesehen werden.

### *Gewebeverteilung*

#### *Nettogewinn an Knochensubstanz*

Auch im Wirkspektrum der Zoledronsäure auf die Osteoblasten sehen wir einen Zusammenhang. Zur Bestimmung der Aktivität dieser Zellen quantifizierten wir das Osteoidgewebe und zeigten einen deutlichen Nettogewinn an Knochensubstanz gegenüber der partikelimplantierten Gruppe.

Sato et al. 1991 beschrieben erstmals, dass die Bisphosphonate an der Oberfläche der Hydroxylapatite der Knochenmatrix binden. Osteoklasten heften sich mittels Integrinen an die Matrix. Die Ansäuerung des Gewebes durch die Bisphosphonate und die erhöhte

Konzentration der Bisphosphonate interferieren dann mit dem Resorptionssaum (ruffled border“) der Osteoklasten und stoppen die Resorption. Reinholz et al. beschrieben im Jahr 2000, dass Bisphosphonate auch auf Osteoblasten direkte Auswirkungen haben. Sie führten Untersuchungen an hFOB (human fetal osteoblast) Zellen durch. In den Versuchen kam es unter Pamidronat-Behandlung zu einer Abnahme der Proliferation von hFOB Zellen in der Kultur, aber dennoch zu einem Anstieg der Konzentration der intrazellulären Proteine, der alkalischen Phosphatase und des Typ 1 Kollagens. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass Pamidronat die Differenzierung zu sich entwickelnden matrixproduzierenden Osteoblasten fördert.

Plotkin et al. 1999 wiesen auf die Wirkung der Bisphosphonate und des Kalzitonins hinsichtlich der Prävention der Apoptose von Osteozyten und Osteoblasten hin. Es bleibt abzuwarten, in wie fern sich die Knochenneubildung unter Zoledronatbehandlung äußert.

In unserem Experiment stellte sich diese Erkenntnis als positiver Nebeneffekt dar, da Knochenneubildung nicht Grundlage des Versuchsaufbaus war. Um eine genauere Aussage über die Knochenneubildung machen zu können, bedarf es einer Gruppe von Versuchstieren, denen nur Zoledronat appliziert werden würde, verglichen mit den partikelimplantierten und Zoledronat applizierten Tieren. Ferner muss der Knochen z.B. mit Tetracyclin markiert werden, um die Knochenneubildung darstellen zu können.

## **6.7 Grenzen des Modells**

Das Kleintiermodell mit Polyethylenabriebpartikeln zeigte aber auch Limitierungen bezüglich seiner Aussagekraft. Zunächst muss das Fehlen des Implantates bedacht werden, das ebenso durch seine biomechanischen Eigenschaften eng mit der Prothesenlockerung verbunden ist. Mechanisch unbelastete Implantate verursachen somit ein anderes histologisches Bild des angrenzenden Gewebes als Implantate des gleichen Werkstoffes mit einer mechanischen Funktion (Hahn et al. 1992). Mechanische Belastungen des Implantates waren selbst bei festsitzenden Implantaten Ursache für Mikrostress. Es kam zu Spannungen bzw. Mikrobewegungen. Als Folge dieser Relativbewegungen trat ein Mikroverschleiß auf (Harris et al. 1989). Eine weitere Problematik stellte der Knochen selbst dar. Wir verwendeten aufgrund der anatomischen Verhältnisse der Maus den im Vergleich großen Schädelknochen anstatt des kleinen Femurknochens. Auch die



Knochenstruktur ist verschieden, wobei der Femurknochen ein Lamellenknochen ist und der Schädelknochen zu den desmoiden Knochen gehört.

Wir implantierten den Mäusen auf die Schädelkalotte ein Vielfaches der jährlich in-vivo entstehenden Polyethylenpartikelmenge, so dass eine Kompensation durch den Organismus der jeweiligen Maus möglicherweise nicht erfolgen konnte.

Darüber hinaus ist der Zeitfaktor diskutabel. Das in-vivo Tiermodell wurde genutzt um die partikelbedingte Osteolyse in der Umgebung des Hüftgelenks zu simulieren. Die Versuchsdauer fand in der relativ kurzen Periode von zwei Wochen statt. Demgegenüber wird der klinische Befund der osteolytischen Aktivität erst nach einem längeren Zeitraum ab einem Jahr sichtbar. Somit stand die akute Osteolyse gegenüber dem chronischen Prozess im Vordergrund.

Deshalb müssen die Ergebnisse mit gewisser Vorsicht interpretiert werden.

Obwohl diese Problematiken und Unterschiede bestehen und wichtig sind, sind wir der Überzeugung, dass dieses Modell eine schnelle und sichere Analyse von pharmakologischen Wirkstoffen erlaubt. Nicht unbedeutend sind die geringen Kosten, die das Modell effektiv gestalteten. Daher bietet das Modell eine hoch sensitive, schnelle, günstige und effektive Möglichkeit, um potentielle Wirkstoffe, die eine partikelbedingte Osteolyse aufhalten, zu erproben.

## **6.8 Ausblick**

Wir konnten zeigen, dass Zoledronat eine knochenprotektive Wirkung hat. Die klinische Rolle des Zoledronat bleibt abzuwarten und bedarf nun einer klinischen Studie am Menschen. Es muss aber unterstrichen werden, dass das Problem der bereits gelockerten Implantate nicht durch die Anwendung der Bisphosphonate gelöst wird. Lediglich das Voranschreiten der partikelbedingten Osteolyse kann bis zum Zeitpunkt der Lockerung beeinflusst werden. Vielmehr muss das Hauptaugenmerk auf die Entwicklung neuer biokompatibler Werkstoffe, die sich resistenter gegenüber Scher- und Abriebkräften zeigen, gelegt werden. Da die Osteolyse selten bei Patienten auftritt, die einen Abrieb der Gelenkpfanne von weniger als 0,1 mm/a aufweisen, sollte diese „Osteolytische Schwelle“ bei der Entwicklung neuer Werkstoffe eingehalten werden (Silva et al. 2002).

Der Prozess der Implantatlockerung begründet sich auf der Partikel-induzierten Osteolyse und benötigt in der Mehrzahl der Fälle eine Revisionsoperation. Die Prävention dieses Krankheitsverlaufes könnte durch eine einmalige Verabreichung eines potenten Bisphosphonates wie z.B. Zoledronat positiv beeinflusst werden. Gemäß der Resultate unserer tierexperimentellen Studie ist Zoledronat sowohl wirksam bevor die Partikel-induzierte Osteolyse beginnt, als auch dann, wenn sie begonnen hat.

Zusammengefasst ergeben die Untersuchungen dieser Arbeit, dass sowohl die kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikel für die in-vivo Forschung im Tierexperiment genutzt werden können als auch dass eine einmalige Dosis von Zoledronat einen vorteilhaften Effekt bezüglich der Partikel-induzierten Osteolyse hat um dem Fortschreiten der Implantatlockerung vorzubeugen.

## 7 Zusammenfassung

Der Hauptgrund und die häufigste Langzeitkomplikation des Gelenkersatzversagens ist die aseptische Lockerung. Dieser Prozess ist auf die Osteolyse zurückzuführen, die durch entstehende Abriebpartikel der Prothesenkomponenten induziert wird.

Neue Bisphosphonate sind zur Behandlung der generalisierten Osteoporose als Einmalgabe entwickelt worden. Ihr Effekt auf die fokale partikelinduzierte Osteolyse wurde bisher nicht untersucht.

Wir untersuchten den Effekt einer Einmalgabe von Zometa® Zoledronat auf die Polyethylenpartikel-induzierte Osteolyse. Hierzu wendeten wir ein Osteolysemodell an murinen Kalvaria an. Wir führten unsere Untersuchungen an C57 BL/J6 Mäusen durch. Das Ausmaß der Knochenresorption wurde anhand der Fläche der Mittelliniensutur an den Giemsa gefärbten Schnitten gemessen und bestimmt. Die Anzahl der Osteoklasten wurde durch die immunhistochemische Tatratreisistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung ermittelt. Für die statistische Analyse wurde one-way ANOVA (analysis of variance between groups) und der Student-t-Test angewendet.

Die Knochenresorption der partikel-implantierten Tiere betrug  $0,26 \text{ mm}^2 \pm 0,08 \text{ mm}^2$  und die direkt nach der Operation mit Zoledronat behandelte Gruppe  $0,14 \text{ mm}^2 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  und  $0,15 \text{ mm}^2 \pm 0,05 \text{ mm}^2$  bei den Tieren mit Partikelimplantation und Zoledronatgabe am vierten postoperativen Tag ( $p=0,006$ ). Die Osteoklastenzahl betrug  $8,7 \pm 2,04$  bei den Tieren ohne Partikelimplantation gegenüber  $20 \pm 8$  bei den Tieren mit Partikelimplantation. Verglichen betrug die Anzahl der Osteoklasten bei den Partikelimplantierten Mäusen und Zoledronatgabe direkt nach der Operation  $9,2 \pm 1,75$  ( $p=0,0001$ ) und  $10,15 \pm 0,84$  bei den Tieren mit Partikel und Zoledronatgabe am vierten postoperativen Tag ( $p=0,0004$ ).

Zusammengefasst ergeben die Untersuchungen, dass eine Einmalgabe von Zoledronat im Osteolysemodell an murinen Kalvaria die Partikel-induzierte Osteolyse deutlich durch eine Einmalgabe subkutan reduziert und so dem Fortschreiten der Prothesenlockerung vorbeugen könnte.

## 8 Literatur

1. Amstutz, H.C., Ma, S.M., Jinnah, R.H., Mai, L. (1982): Revision of aseptic loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop* 170, 21-33.
2. Allen, M., Brett, F., Milett, F., Rushton, N. (1996): The effects of particulate polyethylene at a weight – bearing bone – implant interface. A study in rats. *J Bone Joint Surg* 78-B, 32-37.
3. Aspenberg, P., Herbertsson, P. (1996). Periprosthetic bone resorption: Particles versus movement. *J Bone Joint Surg Am* 78, 641-646.
4. Aspenberg, P., Van der Vis, H. (1998): Migration, particles and fluid pressure: A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop* 352, 75-80.
5. Amling, M., Neff, L., Priemel, M., Schilling, A.F., Rueger, J.M., Baron, R. (2000): Progressive increase in bone mass and development of odontomas in aging osteopetrotic c-src-deficient mice. *Bone*, 27 (5), 603-610.
6. Bang, F, Levin, F.B. (1968): Clottable protein in Limulus: ist localization and kinetics of ist coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 19 (1), 186-197.
7. Benz, E.B., Federman, M., Godleski, J.J., Bierbaum, B.E., Thornhill, T.S., Spector, M. (2001): Transmission electron microscopy of intracellular particles of polyethylene from joint replacement prostheses: size distribution and cellular response. *Biomaterials* 22 (21), 2835-2842.
8. Berenson, J.R., Lichtenstein, A., Porter, L. (1998): Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. *J Clin Oncol* 16, 593-602.
9. Borah, B., Dufresne T.E., Chmielewski P.A., Gross, G.J., Prenger, M.C., Phipps, R.J. (2002): Risedronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Min Res* 17, 1139-1147.
10. Bos, I., Löhrs, U. (1991): Morphologie der Sekundärkapsel bei Hüftgelenkendoprothesen und Bedeutung des Materials. *Pathologe* 12, 82.

11. Breusch, S., Mau, H. 2002: Hüfte und Oberschenkel. In: Breusch, S., Mau, H., Sabo, D. (Hrsg.): *Klinikleitfaden Orthopädie*. S.642-643. 4. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München.
12. Brown, G.C., Lockshin, M.D., Salvati, E.A. (1977): Sensitivity to metal as a possible cause of sterile loosening after cobalt-chromium total hip-replacement arthroplasty. *J. Bone Joint Surg Am* 59, 164-168.
13. Callaghan, J.J., Salvati, E.A., Pelicci, P.M., Wilson, P.D. Jr., Ranawat, C.S. (1985): Results of revision for mechanical failure after cemented total hip replacement, 1979 to 1982: a two to five year follow up. *J Bone Joint Surg* 67-A, 1074-1085.
14. Charnley, J. (1961). Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet* 1, 1129-1132.
15. Charnley, J., Eftekar, N. (1969): Postoperative infection in total prosthetic replacement arthroplasty of the hip-joint. With special reference to the bacterial content of the air of the operating room. *Br J Surg* 56 (9), 641-649.
16. Cheer, S.M., Noble S. (2001): Zoledronic Acid. *Drugs*. 61(6), 799-805.
17. Childs, L.M., Goater, J.J., O'Keefe, R.J., Schwarz, E.M. (2001): Efficacy of Etanercept for wear debris –induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 16, 338-347.
18. Cohen, J. (1959). Assay of foreign-body reaction. *J Bone Joint Surg Am* 41, 152-166.
19. Derenne, S., Amiot, M., Barille, S. (1999): Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner res* 14, 2048-2056.
20. Evans, E.M. (1974): Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg* 56 B, 626-642.
21. Evans C.E., Braidman, I.P. (1994). Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. *Bone Mineral* 26, 95-107.
22. Fisher, J.E., Rodan, G.A., Reszka A.A. (2000): In vivo effects of bisphosphonates on the Osteoclast mevalonate pathway. *Endocrinology* 141, 4793-4796.
23. Fleisch, H. (1997): Mechanisms of action of the bisphosphonates. *Medicina (B Aires)* 57 (Suppl 1), 65-75.

24. Gelb, H., Schumacher, H.R., Cuckler, J. (1994): In vivo inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: Effect of size, morphology and surface area. *J Orthop Res* 12, 83-92.
25. Green, J.R., Müller, K., Jaeggi, K.A. (1994): Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 9, 745-751.
26. Green, J.R. (1996): Zoledronate: the preclinical pharmacology. *Br J Clin Pract* 87, 16-18.
27. Green, T.R., Fisher, J., Matthews, J.B., Stone, M.H., Ingham, E. (2000): Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res.* 53 (5), 490-497.
28. Guise, T.A., Mundy, G.R. (1998): Cancer and bone. *Endocr Rev* 19, 18-54.
29. Goodmann, S.B., Fornasier, V.L., Kei, J. (1988): The effects of bulk versus particulate polymethylmethacrylate on bone. *Clin Orthop* 232, 255-262.
30. Hahn, M., Vogel, M., Schultz, C., Niecke, M., Delling, G. (1992): Histologische Reaktionen an der Knochen-Implantatgrenze und der Corticalis nach mehrjährigen Hüftgelenkersatz. *Chirurg* 63, 958-963.
31. Hanssen, A.D., Rand, J.A (1988): A comparison of primary and revision knee arthroplasty using the kinematic stabilizer prosthesis. *J Bone Joint Surg*; 12-A: 720-731.
32. Harris, W.H., Zalenksi, E.B., Jasty, M. (1989): The crucial failure in cementless femoral components of total hip replacement. Vortrag, The 15 th Annual Meeting of society for Biomaterials, Lake Buena Vista, Florida, USA.
33. Harris, W.H. (1992): The first 32 years of total hip arthroplasty. One surgeon`s perspective. *Clin Orthop* 274, 6-11.
34. Harris, W.H. (1994): Osteolysis and particle disease in hip replacement. A review. *Acta Orthop Scand* 65 (1), 113-123.
35. Harris, W.H. (1995): The problem is osteolysis. *Clin Orthop* 311, 46-53.
36. Harris, W.H. (2001): Wear and periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop* 392, 66-70.

37. Herren, T., Remagen, W., Schenk, R. (1987): Histologie der Implantat-Knochengrenze bei zementierten und nicht zementierten Endoprothesen. *Orthopäde* 16, 239-251.
38. Horowitz, S.M., Algan, S.A., Purdon, M.A. (1996): Pharmacologic inhibition of particulate-induced bone resorption. *J Biomed Mater Res* 31, 91-96.
39. Hortobagyi, G.N., Theriault, R.L., Lipton, A. (1998): Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. *J Clin Oncol* 16, 2038-2044.
40. Howie, D.W., Vernon-Roberts, B., Oakeshott, R., Manthey, B. (1988): A rat model of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J Bone Joint Surg* 70-A, 257-263.
41. Jacobs, J.J., Roebuck, K.A., Archibeck, M., Hallab, N.J., Glant, T.T. (2001): Osteolysis: Basic Science. *Clin Orthop* 393, 71-77.
42. Jasty, M.J., Jiranek, W., Harris, W.H. (1992): Acrylic fragmentation in total hip replacements and its biological consequences. *Clin Orthop* 285, 116-128.
43. Khosla, S. (2001): Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142:5050-5055.
44. Kim, Y.H., Kim, J.S., Cho, S.H. (1999): Primary total hip arthroplasty with cementless porous-coated anatomic total hip prosthesis: 10- to 12-year results of prospective and consecutive series. *J Arthroplasty* 14, 538-548.
45. Knoch von, M., Engh, C.A., Sychterz, C.J., Willert, H.G. (2000): Migration of Polyethylene wear debris in one type of uncemented femoral component with circumferential porous coating. *J Arthroplasty* 15, 72-78.
46. Kurtz, S.M., Muratoglu, O.K., Evans, M., Edidin, A.A. (1999): Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20(18), 1659-1688.
47. Kwon, Y.S., Maloney, W.J., Bataractcha, T., Clohisy, J., Sung, J.H., Erdmann, J., Teitelbaum, S.L. (2000): A simple animal model for particulate debris-induced osteolysis using mouse calvarium. 46th annual meeting, Orthopaedic Research Society, March 12-15, 2000, Orlando, Florida.

48. Luckmann, S.P., Hughes, D.E., Coxon, F.P. (1998): Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including ras. *J Bone Min Res* 13, 2021-2026.
49. Maloney, W.J., Smith, R.L. (1996): Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty: the role of particulate wear debris *Instr Course Lect* 45, 171-182.
50. Maloney, W.J., Smith, R.L., Castro, F., Schurmann, D.J. (1993): Fibroblast response to metallic response in vitro: enzyme induction, cell proliferation and toxicity. *J Bone Joint Surg* 75 A, 835-844.
51. Maloney, W.J., Smith R.L., Castro F. (1995): Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am* 75, 835-844.
52. Margevicius, K.J., Bauer, T.W., McMahon, J.T., Brown, S.A., Meritt, K. (1994): Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg* 76-A, 1664-1675.
53. Merkel, K.D., Erdmann, J.M., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. (1999): Tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154, 203-210.
54. Miller, J., Burke, D.L., Stachiewicz, J.W. (1978): Pathophysiology of loosening of femoral components in total hip athroplasty: Clinical and experimental study of cement fracture and loosening of the cement-bone interface. *In: The Hip: Proceedings of the Sixth Open Scientific Meeting of the Hip Society*. S. 64-86. St. Louis, CV Mosby.
55. Millett, P.J., Allen, M.J., Bostrom, M.P. (2002): Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. *J Bone Joint Surg Am*. 84-A(2), 236-249.
56. Mittelmeier, H.(1988): Grundsätzliches zur Entwicklung nicht zementierter Prothesen unter Berücksichtigung der Autophor-Endoprothese. *In: Hipp, E., Gradinger, R., Hechl, H. (Hrsg.): Zementlose Hüftgelenksendoprothetik*. S. 40-49. Demeter, Gräfeling
57. Morscher, E.W. (1983): Cementless total hip athroplasty. *Clin Orthop* 181, 75-81.



58. Mulroy, R.D. jr., Harris, W.H. (1990). The effect of improved cementing technique on component loosening in total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 72 B, 757-762.
59. Mundy, G.R. (1993): Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem* 53 (4), 296-300.
60. Mundy, G.R. (1999). Cellular and molecular regulation of bone turnover. *Bone* 24 (5 Suppl), 35-38.
61. Mundy, G., Garrett, R., Harris, S. (1999): Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286, 1946-1949.
62. Murray, D.W., Rushton, N. (1990): Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J Bone Joint Surg* 72-B, 988-992.
63. Paiement, G., Jasty, M., Goldring, S. (1986): Difference in tissue response to particulate biomaterials (metal vs polymers) in a rabbit wound chamber model. *Trans Orthop Res Soc* 11, 115.
64. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. (1987): Bone Histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Mineral Research* 6, 595-610.
65. Pataki, A., Müller, K., Green, J.R., Ma, Y.F., Li, Q.N., Jee, W.S.S. (1997): Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during and after treatment. *Anat Rec* 249 (4), 458-468.
66. Piltz, W. (1993): Biomechanik zementfreier Endoprothetik. *Z Orthop* 131, 483-487.
67. Plenk, H. jr. (1998). Prosthesis-bone interface. *J Biomed Mater Res* 43 (4), 350-355.
68. Plotkin, L.I., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., Bellido, T. (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104, 1363-1374.
69. Rae, T. (1986): The biological response of bone resorption to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles: Long-term animal studies. *Biomaterials* 7, 37-40.

70. Reid, I.R., Brown, J.P., Burckhardt, P., Horowitz, Z., Richardson, P., Trechsel, U., Widmer, A., Devogelaer, J.P., Kaufman, J.M., Jaeger, P., Body, J.J., Brandi, M.L., Broell, J., Di Micco, R., Genazzani, A.R., Felsenberg, D., Happ, J., Hooper, M.J., Ittner, J., Leeb, G., Mallmin, H., Murray, T., Ortolani, S., Rubinacci, A., Saaf, M., Samsioe, G., Verbruggen, L., Meunier, P.J. (2002): Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 28, 346 (9), 653-661.
71. Reinholz, G.G., Getz, B., Pederson, L. (2000): Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60, 6001-6007.
72. Rodan, G.A., Fleisch, H.A. (1996): Bisphosphonates: mechanism of action. *J Clin Invest* 97, 2662-2696.
73. Rogers, M.J., Frith, J.C., Luckmann, S.P. (1999): Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 24 (Suppl), 73-79.
74. Rooker, G.D., Wilkinson, J.D. (1980). Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement: A prospective study. *J Bone Joint Surg Br* 6, 502-505.
75. Russel, R.G., Rogers, M.J., Frith, J.C. (1999): The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res* 14 (Suppl), 53-65.
76. Sabokbar, A., Fujikawa, Y., Murray, D.W., Athanaou, N.A. (1997): Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption. *Ann Rheum Dis* 57, 614-618.
77. Santavirta, S., Konttinen, Y., Bergroth, V. (1991): Lack of immune response to methyl methacrylate in lymphocyte cultures. *Acta Orthop Scand* 62, 29-32.
78. Santavirta, S., Nordstrom, D., Metsarinne, K. (1993): Biocompatibility of polyethylene and host response to loosening of cementless total hip replacement. *Clin Orthop* 297, 100-110.
79. Santavirta, S., Takagi, M., Gomez-Barrena, E., Nevalainen, J., Lassus, J., Salo, J., Konttinen, Y.T. (1999): Studies of host response to orthopaedic implants and biomaterials. *J Long Term Eff Med Implants* 9 (1-2), 67-76.

80. Sato, M., Grasser, W., Endo, N. (1991): Bisphosphonate action: alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88, 2095-2105.
81. Schmalzried, T.P., Jasty, M., Harris, W.H. (1992): Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* 74 (6), 849-863.
82. Schmalzried, T.P., Akizuki, K.H., Fedenko, A.N. (1997). The role of access of joint fluid to bone in periarticular osteolysis: A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am* 79, 100-110.
83. Schwarz, E.M., Benz, E.B., Lu, A.P., Goater, J.J., Mollano, A.V., Rosier, R.N., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J. (2000): Quantitative small animal surrogate to evaluate drug efficacy in preventing wear-debris –induced osteolysis. *J Orthop Res* 18, 849-855.
84. Schwarz, E.M., Lu, A.P., Goater, J.J., Benz, E.B., Kollias, G., Rosier, R.N., Puzas, J.E., O'Keefe, R.J. (2000): Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappa B signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18 (3), 472-480.
85. Shanbag, A.S., Jacobs, J.J., Glant, T.T. (1994): Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 76, 60-67.
86. Shanbhag, A.S., Hasselman, C.T., Rubash, H.E. (1997): The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop.* 344, 33-43.
87. Shanbag, A.S., Jacobs, J.J., Glant, T.T. (1994): Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 76 A, 60-67.
88. Silva, M.J., Sandell, L.J. (2002): What's New in Orthopaedic Research. *J Bone Joint Surg Am* 84A (8), 1490-1496.
89. Skoglund, B., Aspenberg, P. (2003): PMMA particles and pressure – a study of osteolytic properties of two agents proposed to cause prosthetic loosening. *J Orthop Res* 21, 196-201.

90. Sprecher, C., Wimmer, M.A. (2001): Size independent morphological description of polyethylene particles. *Journal of Biomechanics* 34, 71.
91. Takeshita, S., Kaji, K., Kudo, A. (2000): Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 15, 1477-1488.
92. Teitelbaum S.L., Abu-Amer, Y., Ross, F.P. (1995): Molecular mechanism of bone resorption. *J Cell Biochem* 59, 1-10.
93. Ungethüm, M. (1988): Werkstoffe (Kunststoff, Keramik, Metall) und Konstruktionsmerkmale zementloser Prothesen. *In*: Hipp, E., Gradinger, R., Hechl, H. (Hrsg.): Zementlose Hüftgelenksendoprothetik. S. 30-38. Demeter, Gräfeling.
94. Van der Vis, H.M, Aspenberg P., Marti R.K. (1998). Fluid pressure causes bone resorption in a rabbit model of prosthetic loosening. *Clin Orthop* 350, 201-208.
95. Venesmaa, P.K. (2001): Alendronate reduces periprosthetic bone loss after uncemented primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study. *J Bone Miner Res* 16, 2126-2131.
96. Willert, H.G. (1977). Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res* 11, 157-164.
97. Willert, H.G., Bertram, H., Buchhorn, G.H. (1990): Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop* 258, 95-107.
98. Willert, H.G. et al. (1993): Particle disease due to wear of ultrahigh molecular weight polyethylene. *In*: Morrey, B.F.(Eds.). Biological, material and mechanical considerations of joint replacement. S. 88. Raven Press, Ltd. New York.
99. Woolson, S.T., Maloney, W.J. (1992): Cementless total hip arthroplasty using porous-coated prosthesis for bone ingrowth fixation. 3 ½-year follow-up. *J Arthroplasty* 7 (Suppl), 381-388.

## 9 Anhang

### 9.1 Bilder

1. Elektronenmikroskopische Aufnahme der eingesetzten Polyethylenpartikel in 5000x Vergrößerung .

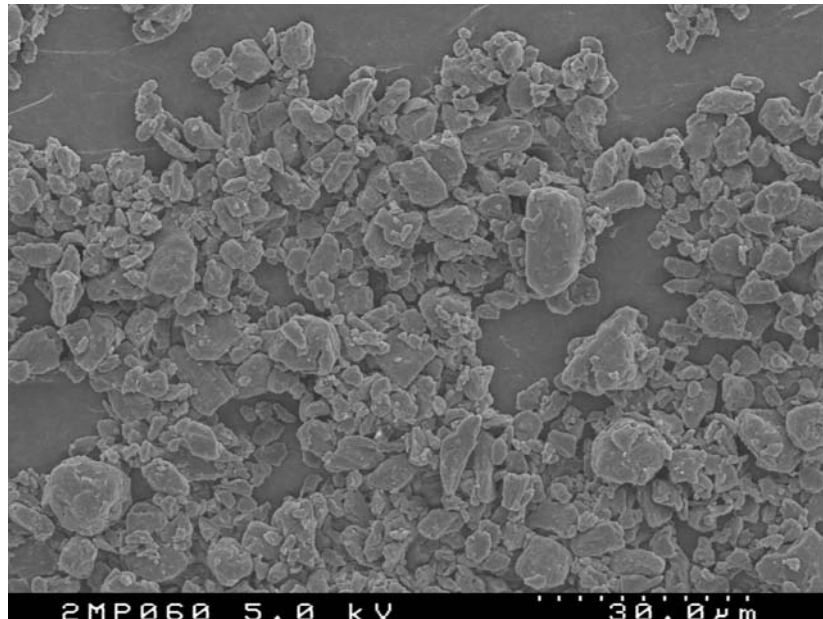


Abbildung 1: Polyethylenpartikel 5000x Vergrößerung

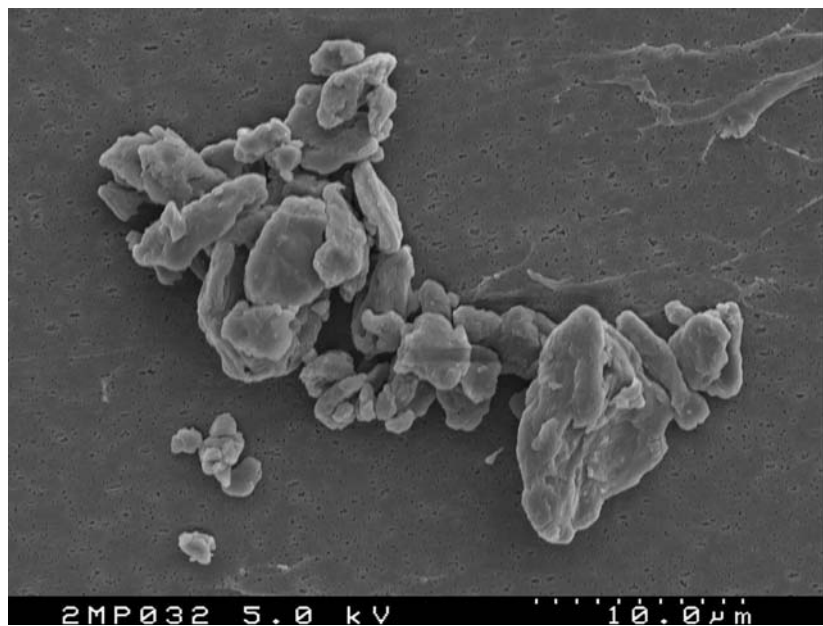


Abbildung 2: Polyethylenpartikel

2. Typische Histologie der Calvaria (Giemsa und Goldnerfärbung) aus der Kontrollgruppe nach der Operation ohne Partikelimplantation (Gruppe I), nach Polyethylenpartikelimplantation (Gruppe II), nach Partikelimplantation und einer Einzeldosis Zoledronat direkt postoperativ (Gruppe III) und nach Polyethylenpartikelimplantation und einer Einzeldosis Zoledronat am vierten postoperativen Tag (Gruppe IV) in 40-facher Vergrößerung. Auf allen Bildern ist das Periost oben zu sehen und die Mittelliniensutur im Zentrum des Bildes lokalisiert.



Maßstab 40x Vergrößerung

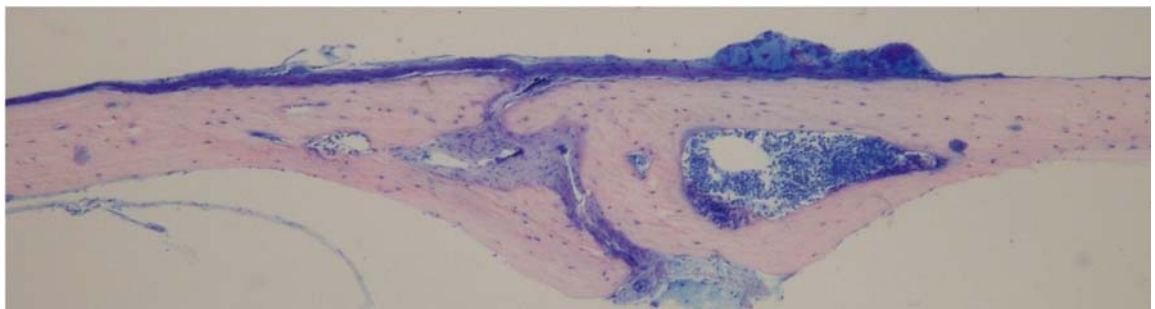


Abbildung 3: Gruppe I 40x

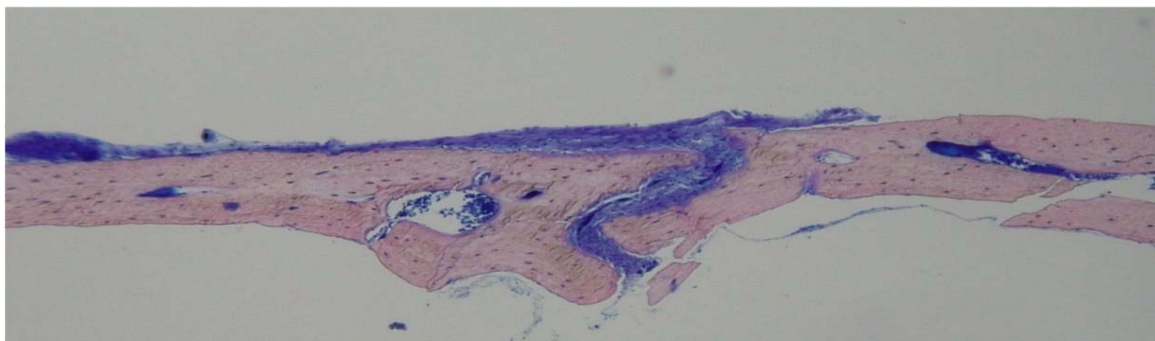


Abbildung 4: Gruppe I 40x

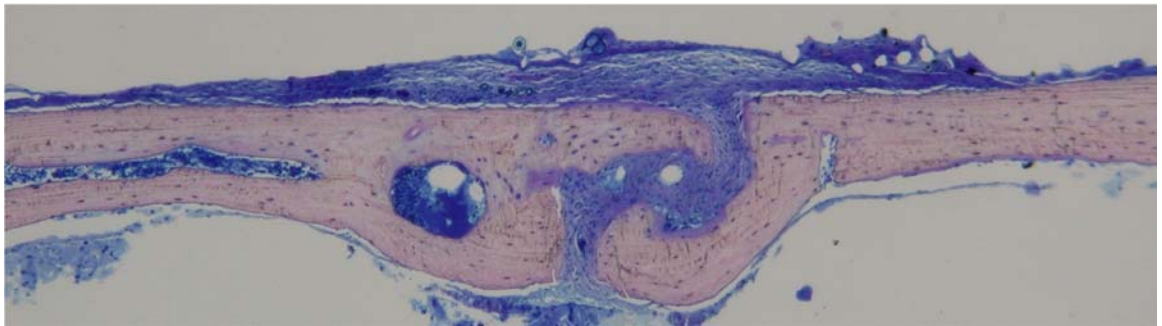


Abbildung 5: Gruppe I 40x

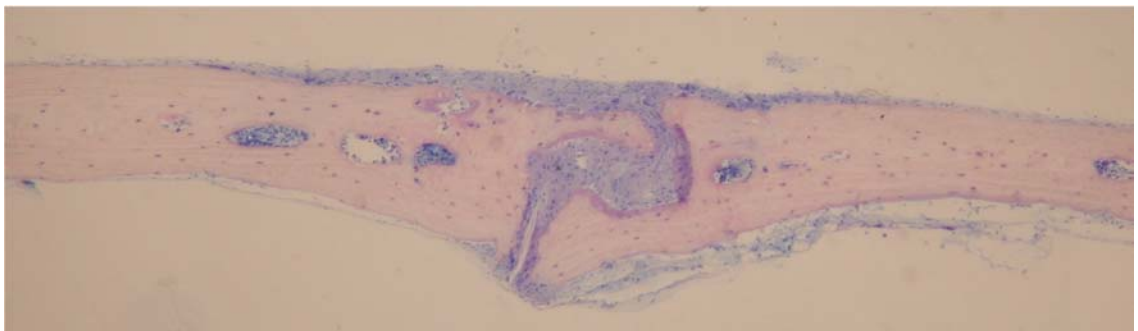


Abbildung 6: Gruppe I 40x

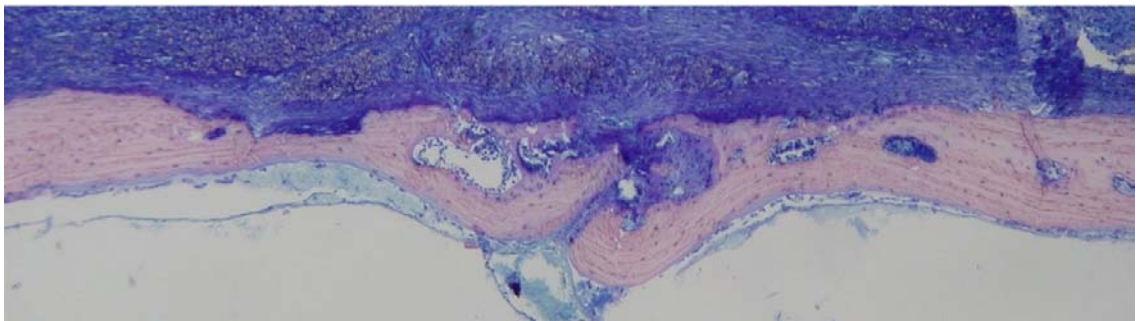


Abbildung 7: Gruppe II 40x

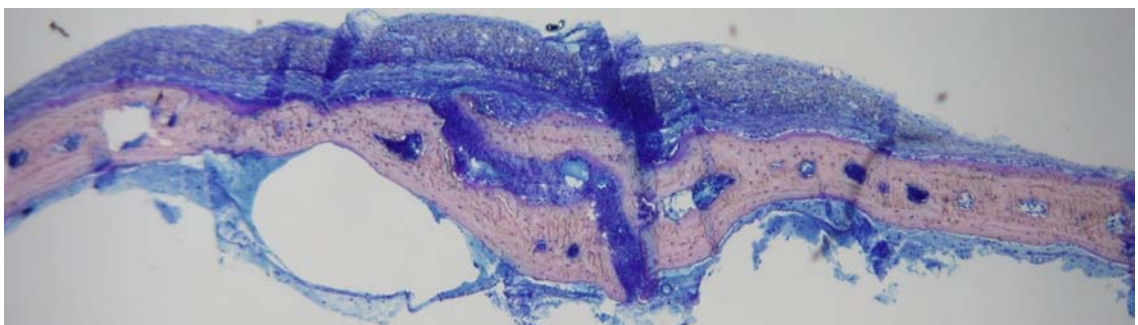


Abbildung 8: Gruppe II 40x



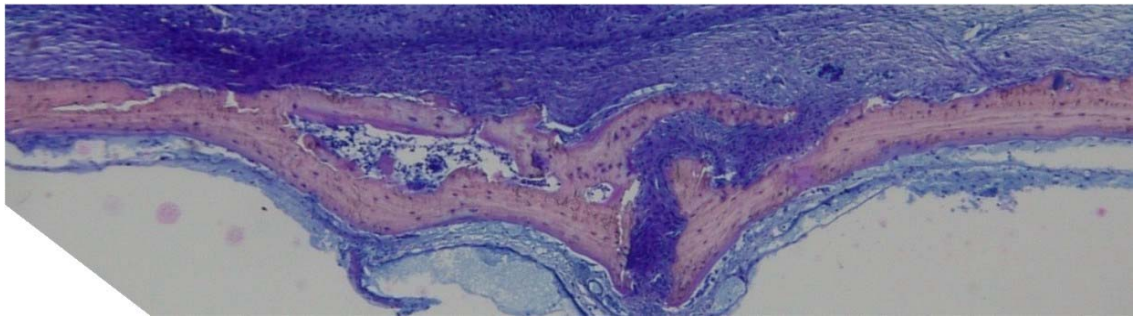


Abbildung 9: Gruppe II 40x

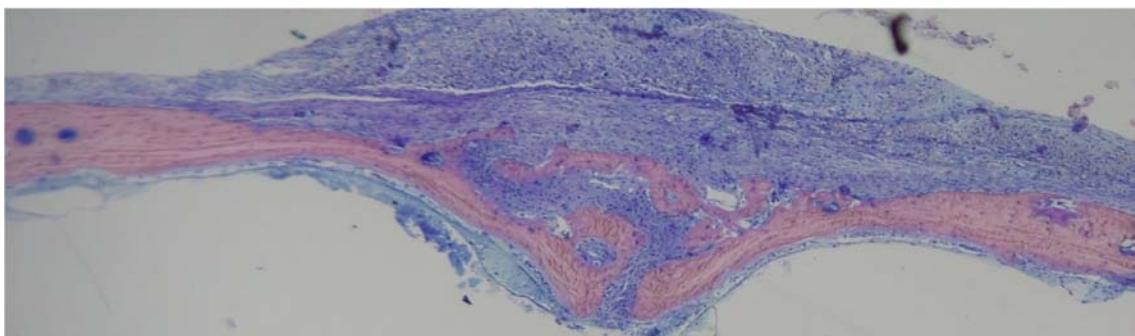


Abbildung 10: Gruppe II 40x

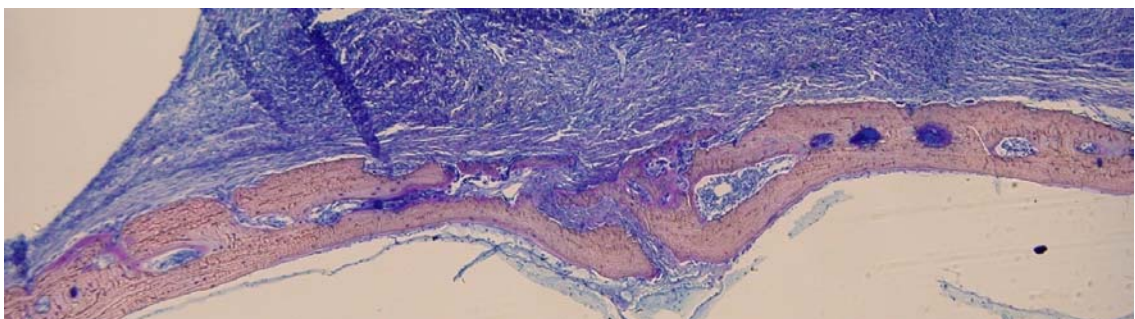


Abbildung 11: Gruppe III 40x

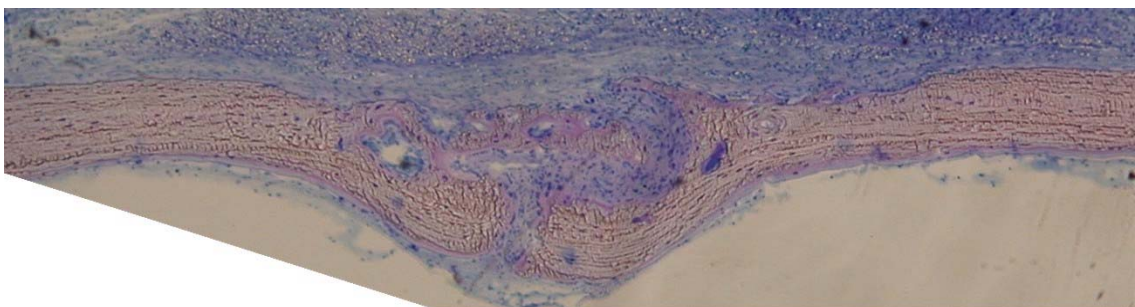


Abbildung 12: Gruppe III 40x



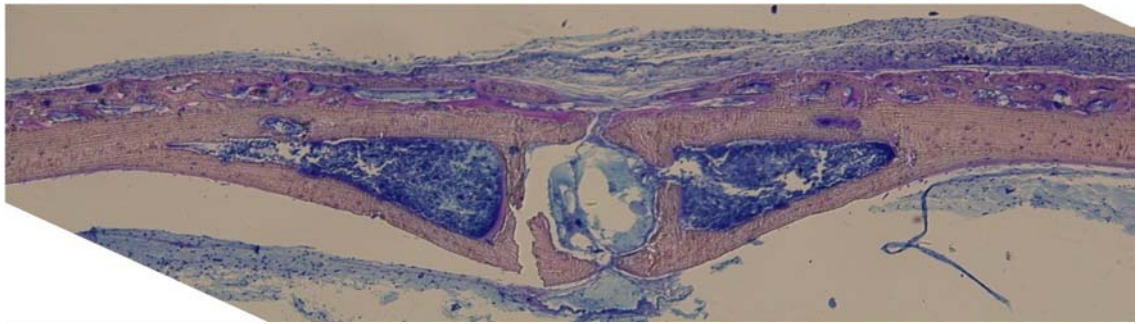


Abbildung 13: Gruppe III 40x

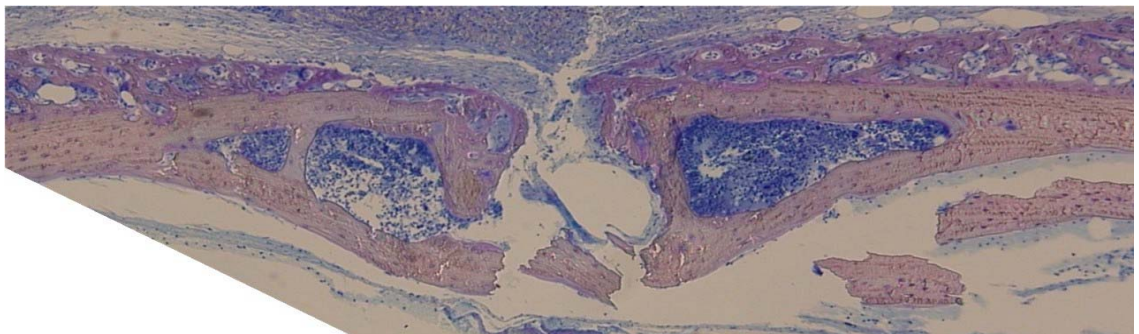


Abbildung 14: Gruppe III 40x

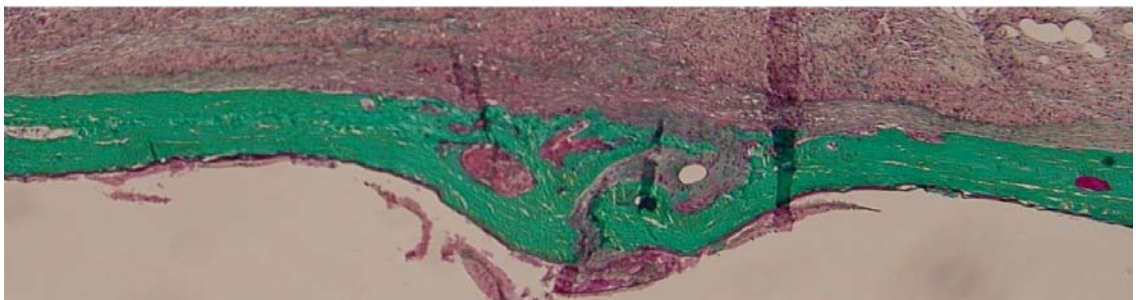


Abbildung 15: Gruppe IV 40x

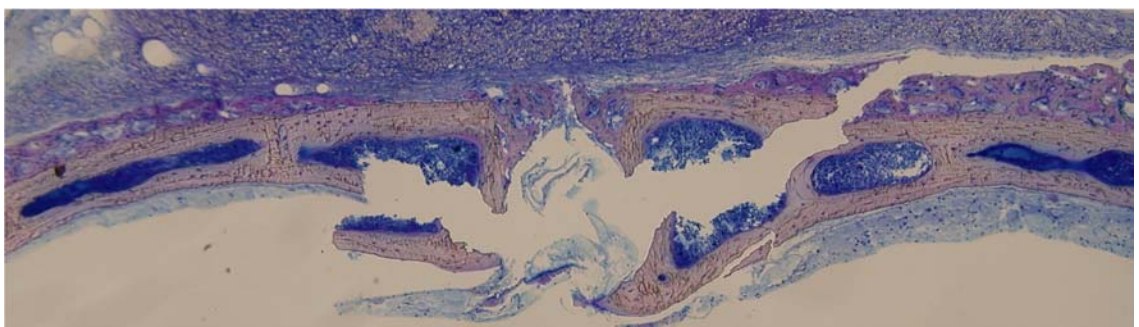


Abbildung 16: Gruppe IV 40x

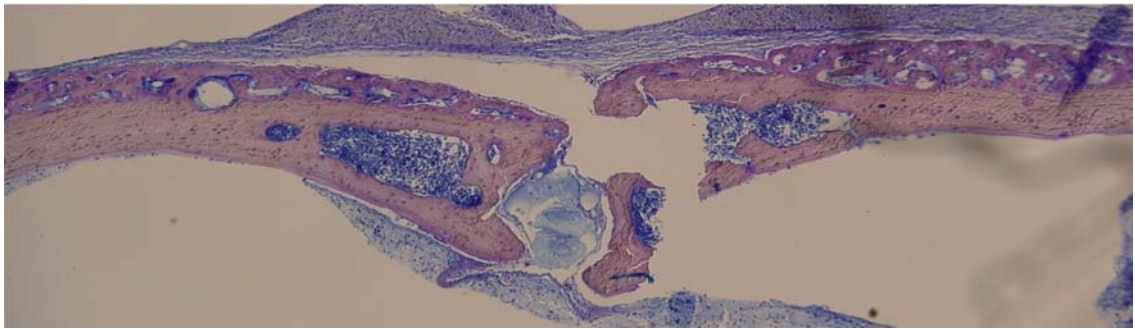


Abbildung 17: Gruppe IV 40x

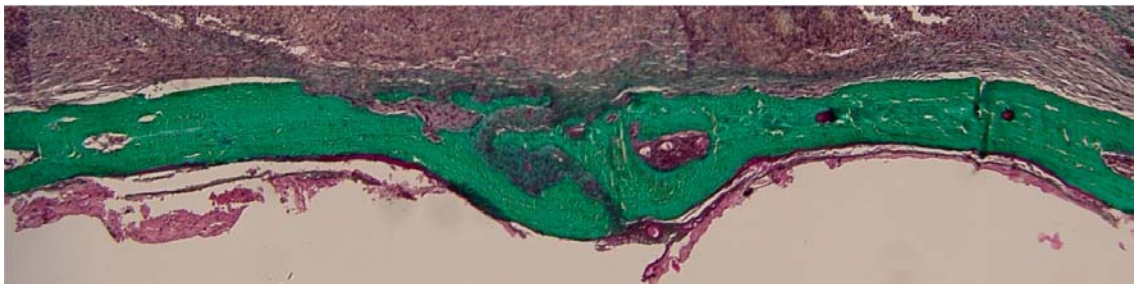


Abbildung 18: Gruppe IV 40x

3. Typische Histologie der Calvaria (TRAP Immunhistofärbung) aus der Gruppe II nach der Operation mit Partikelimplantation in 40-facher Vergrößerung. In den Resorptionslakunen sind die Osteoklasten immunhistochemisch rot angefärbt. Auf dem Bild ist das Periost oben zu sehen und die Mittelliniensutur im Zentrum des Bildes lokalisiert.

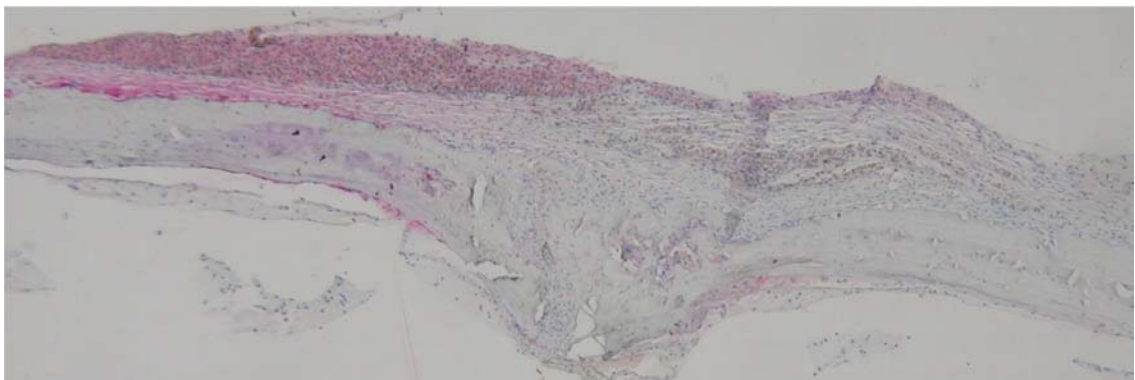


Abbildung 19: TRAP Färbung Gruppe II 40-fach

## 9.2 Limulus Amoebocyten Assay

Alle Verdünnungen wurden mit endotoxinfreiem Aqua dest. durchgeführt. Es wurde nur mit pyrogenfreien Pipettenspitzen, Pipetten und Röhrchen gearbeitet. (Endosafe Limited

Charles River, Endosafe Tubes (13x100 mm) Depyrogenated Tubes Tested to < 0,001 EU/ml, Kent/England)

Der Standard wurde auf Raumtemperatur gebracht, mit dem Vortexer gerührt und in die endotoxinfreien Röhrchen überführt.

Aus diesem Standard wurde eine Verdünnung hergestellt, die einer Konzentration von 10 EU/ml entspricht.

Hier: 0,5 ml aus Standard mit 3,5 ml H<sub>2</sub>O = 10 EU/ml (1:8).

Aus dieser Verdünnung wurde wiederum eine 1:10 Verdünnung hergestellt, so dass die Gebrauchsverdünnung eine Konzentration von 1 EU/ml enthielt.

Hier: 250µl aus Standard I mit 2,5 ml H<sub>2</sub>O = 1 EU/ml (1:10).

Im zweiten Arbeitsschritt wurden die LAL Röhrchen gefüllt:

- (1) Negativkontrolle = ein Röhrchen mit 200 µl dest.
- (2) Positivkontrolle = ein Röhrchen 100 µl dest.+ 100 µl 1. Standardverdünnung
- (3) Proben
  - 1. Röhrchen : 200 µl Probe
  - 2. Röhrchen : 100 µl + 100 µl 1. Standardarbeitsverdünnung  
(diente als Produktkontrolle, zum Nachweis eventuell vorhandener Hemmstoffe)
- (4) Inkubation im 37 °C warmen H<sub>2</sub>O Bad

PEP Probe	Negativ Kontrolle	Positiv Kontrolle
Negativ (-) [flüssig]	Negativ (-) [flüssig]	Positiv (+) [geliert]

### 9.3 Herstellung der Histologien

Die Herstellung der Präparate sah eine viertägige Aufbereitung vor.

#### *1. Tag - Entwässerung in Aceton*

Am 1.Tag wurde der Knochen aus der Schafferschen Lösung genommen. Eine Stunde wurde der Knochen in 70 % Aceton (70 ml Aceton reinst + 30 ml Citratpuffer (pH 6,0)), danach über Nacht in 5% Aceton (95 ml Aceton reinst + 5 ml Polyethylenglycol) entwässert.

## 2. Tag - Einbetten des Knochens in den Kunstharz

Zum Entstabilisieren von Methylmethacrylat + Butylmethacrylat wurden je 140 g Aluminiumoxid 90 in einen Filter gegeben und basisch filtriert (1 Liter). Die entstabilisierten Harze wurden bei – 15 °C aufbewahrt und der Boden mit Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) bedeckt.

Vor dem Ausgießen wurde der Knochen zweimal in Aceton für je 30 Minuten, zweimal in Xylol für je 30 Minuten und zweimal in einem Kunststoffgemisch bestehend aus 2 Teile Methylmethacrylat + 3 Teilen Butylmethacrylat + 2 % Polyethylenglycol 400 (PEG) für 45 Minuten getränkt.

Hier:            *200 ml Methylmethacrylat (MM) + 300 ml Butylmethacrylat (BM) =*  
                       *500 ml Gebrauchslösung + 10 ml Polyethylenglycol (PEG)*

Der Schädelknochen wurde in vier Streifen geschnitten, diese vier Streifen stützten sich gegenseitig vor dem Umfallen in den Kunststoffröhrchen und gewährleisteten eine quere Schnittführung zur Mittelliniensutur.

Für das Ausgießen der Mäuseschädel wurden zwei Lösungen benötigt.

Lösung A:    2 Teile Methylmethacrylat + 2 % Benzoylperoxid

Hier:            *200 ml Methylmethacrylat + 4 g Benzoylperoxid bei – 15 ° C haltbar*

Lösung B:    3 Teile Butylmethacrylat + 1 % PEG + 1% N,N-Dimethyl-p-toluidin

Hier:            *200 ml Butylmethacrylat + 2ml PEG + 2 ml N,N-Dimethyl-p-toluidin*  
                       *bei + 4° C aufbewahren*

Es wurden zwei Teile Lösung A und drei Teile Lösung B ineinander gegeben und ergaben das Ausgießgemisch der Präparate. Die Mäuseschädelknochen härteten mit dem Ausgießgemisch im Glasgefäß über Nacht im Kühlschrank aus.

## 3. Tag – Herstellung und Schneiden der Präparate

Der Block wurde zum Schneiden vorbereitet, und das Glasgefäß wurde entfernt. Der Kunststoffblock wurde dreieckig zugesägt und scharfe Kanten gefeilt.

Der Kunststoffblock wurde am Rotationsmikrotom mit der zugesägten Spitze nach oben eingespannt. Zum Schneiden am Rotationsmikrotom mittels D-Messer wurde eine

---

Einstellung von 4 µm vorgenommen und während des Schneidevorgangs das Messer und der Block mit 30 % Alkohol (Schneidflüssigkeit) befeuchtet.

#### *Objektträgerbeschichtung*

Es wurden Giemsa- und Goldner- Färbungen durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger folgendermaßen beschichtet:

190 ml Aceton reinst + 10 ml 3-Triethoxysilyl-propylamin für 1 Minute  
2 x 5 Minuten Aceton (Diagonal) gespült und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet.

Für die durchgeführten Tetracyclin-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) - Färbungen wurden speziell beschichtete Objektträger Histo Bond ® (Firma Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) benötigt.

#### *Aufziehen der Schnitte auf beschichteten Objektträger*

Die 4 µm Schnitte des Schädelknochens wurden auf die beschichteten Objektträger gezogen und mittels einer Lösung aus 80 ml 70 % Alkohol + 15 ml Methylacetat gestreckt.

Die gestreckten Schnitte wurden mit Polyethylenfolie abgedeckt und angedrückt, in eine Presse eingespannt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank getrocknet.

#### *4. Tag – Vorbereiten zum Färben*

Die Schnitte wurden aus der Presse entnommen, die Folien entfernt und entacrylatet.

Zunächst 1x 15 Minuten in Toluol, dann 15 Minuten in Xylol, dann 1x 5 Minuten in 99 % Alkohol, danach 1x 5 Minuten in 96 % Alkohol und zum Abschluß 1x 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

### 9.3 Färben der Präparate

#### *Giemsa Färbung*

Der entacrylierte Schnitt wurde 45 – 60 Minuten in der Giemsalösung (60 ml Aqua dest. + 15 ml Giemsa) inkubiert. Es folgte eine Differenzierung in 96 % Isopropylalkohol. Der gefärbte Schnitt wurde mit Isopropylalkohol und Xylol gespült und dann in Eukitt ® eingebettet.

#### *Goldner Färbung*

Der ebenfalls entacrylierte Schnitt wurde 60 Minuten in Eisenhämatoxylin nach Weigert inkubiert. Im Anschluß 10 Minuten mit Leitungswasser abgespült und weitere 30 Minuten mit Ponceau de Xylidine behandelt.

Anschließend wurde folgendes Procedere durchlaufen:

1 % Essigsäure

mit Aqua dest gespült

15 Minuten Lichtgrün

1 % Essigsäure

mit Aqua dest. gespült

Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und schließlich in Eukitt ® eingebettet.

#### *TRAP – Färbung*

Färbeprotokoll für Immunhistochemische TRAP

Die Schnitte wurden in je 2 x 15 Minuten Toluol; 2 x 15 Minuten Xylol; 2 x 15 Minuten Aceton und Aqua dest. entacrylatet.

#### *Kochen in Citratpuffer*

Herstellung des Kochpuffers:

2,1 g Zitronensäuremonohydrat (Merck Nr. 244) in 1 Liter Aqua dest. lösen;  
mit ca. 10 ml Natriumhydroxid auf pH 6,0 einstellen



Der Topf wurde mit genügend Volumen aufgefüllt, so dass die Schnitte während der Kochprozedur bedeckt blieben. Die Schnitte wurden im kalten Puffer erhitzt, der Kochpuffer wurde bei geöffnetem Deckel erwärmt und 1-2 Minuten kochen gelassen. Im Anschluss wurden die Schnitte ca. 20 Minuten abkühlt und im Anschluss aus dem Kochpuffer entnommen und in Spülpuffer transferiert.

### *Immunhistofärbung*

Die Schnitte wurden 60 Minuten mit den Antikörper Tetrat Resistente Saure Phosphatase (Clone 26 E5, Ig Class IgG2b AK Verdünnung 1:100, Novo Castra Laboratories Ltd., United Kingdom,) inkubiert. Dann wurde der inkubierte Schnitt mit Phosphatpuffer OptiMax Wash buffer HK583-5K 500 ml - 8,5 g NaCl + 1,43 g  $K_2HPO_4$  + 0,25 g  $KH_2HPO_4$  ad 1000 ml Aqua dest. (Bio Genex, USA) abgespült.

Folgendes Procedere folgte im Anschluss:

- 30 Minuten Link;
- Spülen mit Phosphatpuffer (PBS = phosphat buffered saline)
- 30 Minuten Label (Streptavidin Alkalische Phosphatase)
- Spülen mit Phosphatpuffer
- 10 Minuten Link wiederholen
- Spülen mit Phosphatpuffer
- 10 Minuten Link wiederholen
- Spülen mit Phosphatpuffer
- 10 Minuten Substrat Fast Red
- Aqua dest
- 30 Sekunden Hämalaun
- 5 Minuten Leitungswasser
- aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol

Die Schnitte wurden mit Eukitt® eingedeckt.

## 9.5 Tabellen

**Tabelle 1: Gruppenverteilung**

Gruppe	Anzahl der Tiere	Operation	Partikel	Zoledronat
<b>I</b>	7	Ja	Keine	Nein
<b>II</b>	7	Ja	Polyethylen	Nein
<b>III</b>	7	Ja	Polyethylen	Ja (postop)
<b>IV</b>	7	Ja	Polyethylen	Ja (4. postop)

**Tabelle 2: Mittelliniensuturfläche in mm<sup>2</sup>**

	<b>GR1A</b>	0,03	<b>GR2A</b>	0,13	<b>GR3A</b>	0,11	<b>GR4A</b>	0,14
	<b>GR1B</b>	0,03	<b>GR2B</b>	0,24	<b>GR3B</b>	0,15	<b>GR4B</b>	0,19
	<b>GR1C</b>	0,06	<b>GR2C</b>	0,28	<b>GR3C</b>	0,20	<b>GR4C</b>	0,12
	<b>GR1D</b>	0,03	<b>GR2D</b>	0,31	<b>GR3D</b>	0,11	<b>GR4D</b>	0,16
	<b>GR1E</b>	0,05	<b>GR2E</b>	0,22	<b>GR3E</b>	0,16	<b>GR4E</b>	0,15
	<b>GR1F</b>	0,03	<b>GR2F</b>	0,26	<b>GR3F</b>	0,13	<b>GR4F</b>	0,10
	<b>GR1G</b>	0,04	<b>GR2G</b>	0,40	<b>GR3G</b>	0,14	<b>GR4G</b>	0,14
<b>Mittelwert</b>		<b>0,04</b>		<b>0,26</b>		<b>0,14</b>		<b>0,14</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>0,01</b>		<b>0,08</b>		<b>0,03</b>		<b>0,03</b>
<b>Min</b>		<b>0,03</b>		<b>0,13</b>		<b>0,11</b>		<b>0,10</b>
<b>Max</b>		<b>0,06</b>		<b>0,40</b>		<b>0,20</b>		<b>0,19</b>

**Tabelle 3: Osteoklastenanzahl / TRAP positive Zellen**

	<b>GR1A</b>	7,50	<b>GR2A</b>	21,63	<b>GR3A</b>	9,63	<b>GR4A</b>	11,17
	<b>GR1B</b>	9,25	<b>GR2B</b>	20,00	<b>GR3B</b>	7,88	<b>GR4B</b>	10,25
	<b>GR1C</b>	10,33	<b>GR2C</b>	17,13	<b>GR3C</b>	8,17	<b>GR4C</b>	10,50
	<b>GR1D</b>	6,17	<b>GR2D</b>	19,25	<b>GR3D</b>	9,63	<b>GR4D</b>	11,00
	<b>GR1E</b>	10,83	<b>GR2E</b>	17,63	<b>GR3E</b>	12,75	<b>GR4E</b>	9,17
	<b>GR1F</b>	6,17	<b>GR2F</b>	19,83	<b>GR3F</b>	7,63	<b>GR4F</b>	9,00
	<b>GR1G</b>	10,50	<b>GR2G</b>	25,50	<b>GR3G</b>	8,75	<b>GR4G</b>	10,00
<b>Mittelwert</b>		<b>8,68</b>		<b>20,14</b>		<b>9,20</b>		<b>10,15</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>2,04</b>		<b>2,81</b>		<b>1,75</b>		<b>0,84</b>
<b>Min</b>		<b>6,17</b>		<b>17,13</b>		<b>7,63</b>		<b>9,00</b>
<b>Max</b>		<b>10,83</b>		<b>25,50</b>		<b>12,75</b>		<b>11,17</b>



Tabelle 4: Gewebeverteilung in %

	Gesamt	Knochen	Osteoid	Knochen-Osteoid	Mittelsutur	Osteolysen	Markraum
GR1A	100,00	79,05	0,00	79,05	3,08	0,74	17,13
GR1B	100,00	84,96	0,00	84,96	3,22	0,46	11,36
GR1C	100,00	86,38	0,00	86,38	6,08	0,00	7,54
GR1D	100,00	84,91	0,00	84,91	3,01	0,00	12,08
GR1E	100,00	86,31	0,00	86,31	2,70	1,77	9,70
GR1F	100,00	84,97	0,00	84,97	3,25	0,00	12,66
GR1G	100,00	79,86	0,00	79,86	2,24	0,55	16,66
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>83,78</b>	<b>0,00</b>	<b>83,78</b>	<b>3,37</b>	<b>0,50</b>	<b>12,45</b>
GR2A	100,00	77,12	2,73	74,39	8,39	1,14	13,35
GR2B	100,00	73,14	2,24	70,90	15,82	3,16	7,64
GR2C	100,00	72,04	0,00	72,04	17,54	1,96	8,45
GR2D	100,00	68,47	0,00	68,47	20,83	2,20	8,50
GR2E	100,00	72,82	0,00	72,82	15,89	0,35	10,94
GR2F	100,00	72,25	0,00	72,25	16,20	1,51	10,04
GR2G	100,00	65,97	0,00	65,97	20,65	3,12	10,25
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>71,69</b>	<b>0,71</b>	<b>70,98</b>	<b>16,47</b>	<b>1,92</b>	<b>9,88</b>
GR3A	100,00	84,29	8,44	77,44	5,25	0,00	8,87
GR3B	100,00	77,90	8,03	71,87	5,96	0,00	14,01
GR3C	100,00	77,50	8,13	71,37	9,80	0,00	12,70
GR3D	100,00	82,66	9,57	73,10	4,03	0,00	12,28
GR3E	100,00	79,96	10,93	69,03	5,53	0,00	15,10
GR3F	100,00	81,00	12,57	68,80	5,84	0,00	12,79
GR3G	100,00	84,22	8,53	75,70	6,07	0,00	9,71
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>81,08</b>	<b>9,46</b>	<b>72,47</b>	<b>6,07</b>	<b>0,00</b>	<b>12,21</b>
GR4A	100,00	81,54	3,16	78,37	7,90	0,00	7,90
GR4B	100,00	83,77	8,84	74,93	9,52	0,00	6,70
GR4C	100,00	74,52	1,16	73,36	6,40	0,00	20,13
GR4D	100,00	83,15	11,49	71,66	6,49	0,00	10,75
GR4E	100,00	80,30	11,05	69,25	6,21	0,00	13,51
GR4F	100,00	73,94	6,06	67,88	3,77	0,00	23,34
GR4G	100,00	78,85	11,05	67,70	5,04	0,00	16,21
<b>Mittelwert</b>	<b>100,00</b>	<b>79,44</b>	<b>7,54</b>	<b>71,88</b>	<b>6,48</b>	<b>0,00</b>	<b>14,08</b>

Tabelle 5: Knochendicke in mm

Knochenaufteilung in mm	-2	-1,5	-1	-0,5	0	0,5	1	1,5	2
GR1A	0,17	0,17	0,17	0,19	0,32	0,20	0,14	0,14	0,16
GR1B	0,19	0,18	0,18	0,21	0,34	0,23	0,19	0,18	0,19

<b>GR1C</b>	0,19	0,17	0,18	0,20	0,28	0,17	0,15	0,18	0,17
<b>GR1D</b>	0,20	0,21	0,17	0,20	0,34	0,21	0,16	0,16	0,17
<b>GR1E</b>	0,16	0,17	0,21	0,21	0,31	0,21	0,15	0,20	0,20
<b>GR1F</b>	0,17	0,22	0,21	0,18	0,23	0,20	0,19	0,20	0,20
<b>GR1G</b>	0,20	0,16	0,19	0,24	0,33	0,26	0,25	0,16	0,18
<b>Mittelwert</b>	<b>0,18</b>	<b>0,18</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,31</b>	<b>0,21</b>	<b>0,18</b>	<b>0,17</b>	<b>0,18</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,016</b>	<b>0,023</b>	<b>0,017</b>	<b>0,019</b>	<b>0,04</b>	<b>0,028</b>	<b>0,038</b>	<b>0,022</b>	<b>0,016</b>
<b>Min</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>	<b>0,17</b>	<b>0,18</b>	<b>0,23</b>	<b>0,17</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,16</b>
<b>Max</b>	<b>0,20</b>	<b>0,22</b>	<b>0,21</b>	<b>0,24</b>	<b>0,34</b>	<b>0,26</b>	<b>0,25</b>	<b>0,20</b>	<b>0,20</b>
<b>GR2A</b>	0,19	0,16	0,14	0,14	0,25	0,20	0,18	0,20	0,20
<b>GR2B</b>	0,21	0,15	0,12	0,13	0,17	0,14	0,12	0,13	0,16
<b>GR2C</b>	0,15	0,14	0,09	0,14	0,24	0,09	0,12	0,12	0,15
<b>GR2D</b>	0,19	0,17	0,12	0,11	0,13	0,14	0,16	0,17	0,21
<b>GR2E</b>	1,75	0,13	0,14	0,17	0,18	0,09	0,13	0,15	0,19
<b>GR2F</b>	0,22	0,18	0,17	0,16	0,16	0,18	0,18	0,16	0,18
<b>GR2G</b>	0,17	0,20	0,21	0,15	0,11	0,21	0,19	0,20	0,19
<b>Mittelwert</b>	<b>0,41</b>	<b>0,16</b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,18</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>	<b>0,16</b>	<b>0,18</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,591</b>	<b>0,024</b>	<b>0,039</b>	<b>0,02</b>	<b>0,052</b>	<b>0,048</b>	<b>0,031</b>	<b>0,031</b>	<b>0,021</b>
<b>Min</b>	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>	<b>0,09</b>	<b>0,11</b>	<b>0,11</b>	<b>0,09</b>	<b>0,12</b>	<b>0,12</b>	<b>0,15</b>
<b>Max</b>	<b>1,75</b>	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>	<b>0,17</b>	<b>0,25</b>	<b>0,21</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>
<b>GR3A</b>	0,35	0,29	0,23	0,28	0,39	0,30	0,23	0,28	0,28
<b>GR3B</b>	0,23	0,25	0,24	0,33	0,41	0,33	0,25	0,23	0,24
<b>GR3C</b>	0,26	0,34	0,41	0,40	0,35	0,29	0,28	0,27	0,20
<b>GR3D</b>	0,40	0,41	0,39	0,40	0,43	0,39	0,39	0,40	0,42
<b>GR3E</b>	0,28	0,26	0,30	0,45	0,42	0,41	0,36	0,37	0,30
<b>GR3F</b>	0,20	0,24	0,29	0,29	0,37	0,30	0,27	0,16	0,27
<b>GR3G</b>	0,25	0,23	0,23	0,29	0,36	0,26	0,23	0,28	0,27
<b>Mittelwert</b>	<b>0,28</b>	<b>0,29</b>	<b>0,30</b>	<b>0,35</b>	<b>0,39</b>	<b>0,33</b>	<b>0,29</b>	<b>0,28</b>	<b>0,28</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,071</b>	<b>0,066</b>	<b>0,075</b>	<b>0,068</b>	<b>0,03</b>	<b>0,055</b>	<b>0,064</b>	<b>0,081</b>	<b>0,068</b>
<b>Min</b>	<b>0,20</b>	<b>0,23</b>	<b>0,23</b>	<b>0,28</b>	<b>0,35</b>	<b>0,26</b>	<b>0,23</b>	<b>0,16</b>	<b>0,20</b>
<b>Max</b>	<b>0,40</b>	<b>0,41</b>	<b>0,41</b>	<b>0,45</b>	<b>0,43</b>	<b>0,41</b>	<b>0,39</b>	<b>0,40</b>	<b>0,42</b>
<b>GR4A</b>	0,32	0,29	0,31	0,32	0,25	0,29	0,23	0,31	0,28
<b>GR4B</b>	0,23	0,26	0,24	0,26	0,33	0,26	0,19	0,20	0,22
<b>GR4C</b>	0,34	0,34	0,31	0,30	0,34	0,35	0,34	0,34	0,29
<b>GR4D</b>	0,35	0,39	0,31	0,32	0,38	0,28	0,22	0,28	0,36
<b>GR4E</b>	0,30	0,28	0,21	0,28	0,31	0,32	0,31	0,31	0,28
<b>GR4F</b>	0,27	0,24	0,22	0,33	0,43	0,37	0,33	0,40	0,33
<b>GR4G</b>	0,30	0,28	0,28	0,31	0,37	0,36	0,30	0,27	0,27
<b>Mittelwert</b>	<b>0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,27</b>	<b>0,30</b>	<b>0,34</b>	<b>0,32</b>	<b>0,27</b>	<b>0,30</b>	<b>0,29</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,041</b>	<b>0,051</b>	<b>0,045</b>	<b>0,025</b>	<b>0,055</b>	<b>0,042</b>	<b>0,059</b>	<b>0,063</b>	<b>0,045</b>
<b>Min</b>	<b>0,23</b>	<b>0,24</b>	<b>0,21</b>	<b>0,26</b>	<b>0,25</b>	<b>0,26</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,22</b>
<b>Max</b>	<b>0,35</b>	<b>0,39</b>	<b>0,31</b>	<b>0,33</b>	<b>0,43</b>	<b>0,37</b>	<b>0,34</b>	<b>0,40</b>	<b>0,36</b>

**Tabelle 6: Knochenneubildung in mm<sup>2</sup>**

	<b>GR1A</b>	0,00	<b>GR2A</b>	0,19	<b>GR3A</b>	0,28	<b>GR4A</b>	0,07
	<b>GR1B</b>	0,00	<b>GR2B</b>	0,21	<b>GR3B</b>	0,18	<b>GR4B</b>	0,14
	<b>GR1C</b>	0,00	<b>GR2C</b>	0,00	<b>GR3C</b>	0,14	<b>GR4C</b>	0,11
	<b>GR1D</b>	0,00	<b>GR2D</b>	0,00	<b>GR3D</b>	0,35	<b>GR4D</b>	0,30
	<b>GR1E</b>	0,00	<b>GR2E</b>	0,00	<b>GR3E</b>	0,30	<b>GR4E</b>	0,36
	<b>GR1F</b>	0,00	<b>GR2F</b>	0,00	<b>GR3F</b>	0,30	<b>GR4F</b>	0,19
	<b>GR1G</b>	0,00	<b>GR2G</b>	0,00	<b>GR3G</b>	0,22	<b>GR4G</b>	0,31
<b>Mittelwert</b>		<b>0,00</b>		<b>0,02</b>		<b>0,25</b>		<b>0,21</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>0,00</b>		<b>0,03</b>		<b>0,08</b>		<b>0,11</b>
<b>Min</b>		<b>0,00</b>		<b>0,00</b>		<b>0,14</b>		<b>0,07</b>
<b>Max</b>		<b>0,00</b>		<b>0,21</b>		<b>0,35</b>		<b>0,36</b>

## 10 Danksagungen

Größten Dank an Herrn Dr. med. Marius von Knoch für die Überlassung des Themas. Er hat mir kreatives Arbeiten ermöglicht und mir immer größte Unterstützung zukommen lassen.

Vielen Dank an die Firma Novartis, Basel, Schweiz für die kostenlose Bereitstellung des Zoledronats und deren finanzielle Unterstützung.

Dank an die Firma Clariant, Gersthofen, Deutschland für die kostenlose Lieferung der kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikel.

Einen ganz besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Franz Löer, Direktor der Orthopädischen Universitätsklinik Essen, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation.

Vielen Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Gero Hilken und das Team des Tierlabors der Uni Duisburg-Essen, die mir das Arbeiten mit Versuchstieren ermöglicht und beigebracht haben. Dank auch an Herrn Dr. med. Andreas Pingsmann, ohne ihn wäre die Durchführung der Tierexperimente nicht möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Stöß, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Frank Henschke, Pathologisches Institut am Johannisstift in Paderborn und besonders an Frau Sylvia Marks, MTA, für deren ausgezeichnete Hilfe und Tätigkeit bei der Aufbereitung der Mäusecalvaria und der Herstellung der Knochenschnitte.

Ein ganz herzlichen Dank für die vielen kleinen, aber effektiven Hilfen bei der Partikelaufbereitung an Frau Dr. rer. nat. Anke Fuchs, Biochemie Uni Duisburg-Essen, und Herrn Prof. Dr. med. Rainer Ansorg, Mikrobiologie Uni Duisburg-Essen. Vielen Dank für die Einweisung in die Histomorphometrie und Überlassung eines Mikroskoparbeitsplatzes an Herrn Prof. Dr. med. Karl-Heinz Schmid und Herrn Dr. med. Olaf Dirsch. Dankeschön

an Herrn Dr. Jonathan Green und Frau Dr. Ulrike Haus für die Angaben zur Zoledronsäure und zum Studiendesign.

Vielen lieben Dank an Frau cand. med. Anja Heckelei für ihre Unterstützung und Kontrollen der Messungen und sprachliche Korrektur dieser Dissertation.

Allergrößten Dank meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Großmutter, denen diese Arbeit gewidmet ist.

Schließlich bedanke ich mich bei all denjenigen, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, aber mir Unterstützung in jeglicher Form zukommen ließen.

**Persönliche Daten:**

Name: Wedemeyer  
Vorname: Christian  
Geburtsdatum/-ort: 12.10.1977, Essen  
wohnhaf in Essen  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch-katholisch

**Eltern:**

Vater Axel Werner Christian Wedemeyer  
geboren am 1. August 1946  
Kaufmann  
Mutter Hildegard Elsbeth Wedemeyer  
geboren am 22. Februar 1950  
Kauffrau

**Schulbildung:**

08 / 1984 - 06 / 1988 kath. Dionysiusgrundschule, Essen  
08 / 1988 - 06 / 1997 privates Don - Bosco - Gymnasium, Essen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Zivildienst:**

07 / 1997 - 08 / 1998 Rettungsdienst, Deutsches Rotes Kreuz, Essen

**Hochschulbildung:**

10 / 1998 - 10 / 2004 Universität Duisburg - Essen: Studiengang Medizin  
10 / 2000 Physikum

---

02 / 2001 - 04 / 2001	Praxisfamulatur Drs. Breiderhoff / Dürfeld
10 / 2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02 / 2002 - 04 / 2002	Famulatur Plastische- und Handchirurgie, St. Barbara Hospital, Duisburg
09 / 2002 - 10 / 2002	Famulatur Allgemeinchirurgie Med. Akademie Nishnij Novgorod, Russland
2003	Wissenschaftsaufenthalt als Research Trainee, Department of Orthopedic Surgery an der Mayo Clinic Rochester / USA
07 / 2003	Wissenschaftlicher Posterpreis der Universität Duisburg – Essen und Vortrag zum Thema: „A Single Dose Of Zoledronic Acid Markedly Decreases Bone Resorption“
09 / 2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10 / 2003 - 09 / 2004	PJ am Universitätsklinikum Essen
11 / 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Sprachen	Deutsch, Englisch, Französisch, Latein