

Humane Osteoblasten und Bisphosphonate

Eine in vitro Studie des Verhaltens von humanen Osteoblasten
unter dem Einfluss von Bisphosphonaten verschiedener
Generationen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Athiná Vassiliadou

aus Athen, Hellas

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Pathologie
Institut für Pathologie

Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. med. dent. J. Klimek

Tag der Disputation: 04.02.2003

Αφιερωμένο στο Δημήτρη,
την Τζένη και το Δημήτρη.

Αφιερωμένο στους γονείς μου,
τη νονά και το νονό μου.

Für Dimitri, Jenny und Dimitri.

Für meine Eltern und Pateneltern.

...Ωρες-ώρες η ζωή μοιάζει πολύ με ένα διδακτορικό. Πρώτα συλλέγουμε τα στοιχεία κι έπειτα τα μελετούμε και τα συνθέτουμε. Σου εύχομαι λοιπόν, να μάθεις όσο πιά πολλά μπορείς στον κόσμο αυτό, να μάθεις για τον εαυτό σου, να πειραματιστείς, γιατί ζήσε τη ζωή, τρύπωσε ακόμη και στις πιά μικρές γωνίτσες της, χωρίς φόβο, αλλά με φρούρηση και με χαρά, μη χάνοντας όμως ποτέ τον στόχο. Όλα αυτά δε για να υπηρετηθεί η ανθρωπότητα...

...Manchmal ähnelt das Leben einer Doktorarbeit. Anfangs sammeln wir die Grundelemente, dann studieren wir sie durch und wir setzen sie zusammen. Also wünsche ich Dir, so viel wie möglich in dieser Welt zu erfahren, über Dich zu erlernen; experimentieren; deswegen lebe das Leben, schlüpfе auch in seine kleinsten Ecken ohne Angst aber mit Wachsamkeit und Freude, verliere jedoch nie das Ziel. Und all dies um der Menschheit zu dienen...

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Physiologie des Knochengewebes und Osteoblasten	7
1.2 Regulation des Auf- und Abbaus von Knochen.....	9
1.3. Knochenerkrankungen und Medikamente.....	12
1.4. Bisphosphonate	15
1.4.1 Pharmakologie	17
1.4.2 Klinische Anwendung	21
1.4.3 Etidronat.....	23
1.4.4 Alendronat	23
1.4.5 Ibandronat	24
1.5 Zellkulturmodelle.....	25
1.5.1 Humane Osteosarkomzellkulturen	26
1.5.2 Humane Osteoblastenkulturen	26
2. Fragestellung.....	28
3. Material und Methoden.....	29
3.1 Verwendete Zellkulturen	29
3.1.1 SAOS - 2	29
3.1.2 Humane Osteoblastenkulturen	29
3.2. Kulturmethode.....	30
3.2.1 Kulturmethode für die SAOS-2 Zellen	30
3.2.2 Kulturmethode für die humanen Osteoblasten	31
3.2.2.1 Gewinnung der Knochenfragmente.....	31
3.2.2.2 Gewinn der Knochenmarkstammzellen (Präosteoblasten).....	31
3.2.2.3 Gewinn der „Collagenase Released“ (aktiven) Osteoblasten.....	32
3.2.2.4 Aussaat der Knochenfragmente - „Treated Explants“ (Osteozyten).....	32
3.2.2.5 Kultivierung und Passagierung.....	32
3.3. Messverfahren	32
3.3.1 Zellproliferation	32
3.3.1.1 Elektronische Partikelzählung	32
3.3.1.2 MTT – Assay	33
3.3.2 Gesamtprotein.....	34
3.3.3 Alkalische Phosphatase	34
3.3.4 Osteocalcin.....	35

3.3.5 C-terminales Propeptid des Procollagens Typ I	36
3.3.6 Interleukin-6.....	36
3.4 Versuche.....	37
3.4.1 Herstellung der Stimulationsmedien	37
3.4.1.1 Serumfreies Medium	37
3.4.1.2 Bisphosphonate.....	38
3.4.2 Passage der Zelllinien auf 96-Lochplatten.....	38
3.4.3 Inkubation der Zelllinien mit den Stimulationsmedien.....	39
3.4.4 Asservierung der Inkubationsmedien	39
3.5 Auswertung und Statistik.....	39
4. Ergebnisse	41
4.1 Einfluss der Bisphosphonate auf die Osteosarkomzelllinie-SAOS	41
4.2 Einfluss der Bisphosphonate auf die normalen humanen Osteoblasten	44
4.2.1 Stammzellen.....	44
4.2.2. „Collagenase released“ Zellen.....	47
4.2.3 „Treated Explants“	50
4.2 Vergleich der verwendeten Bisphosphonate.....	53
4.2.1 Etidonat	53
4.2.2 Alendronat	56
4.2.3 Ibandronat	59
5. Diskussion	63
5.1 Biochemische Marker des Knochenaufbaus	63
5.2 Reagibilität der humanen Osteoblasten auf Bisphosphonate.....	66
5.2.1 Etidronat	67
5.2.2 Alendronat	67
5.2.3 Ibandronat	68
5.3 Bewertung des Zellkulturmodells	69
5.4 Einfluss der Bisphosphonatbehandlung auf die osteoblastäre Interleukin-6-Expression.....	72
6. Zusammenfassung	75
7. Literaturverzeichnis	78
8. Anhang	100
Danksagung.....	101
Lebenslauf	102

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
1,25(OH) ₂ D ₃	Dihydroxacholecalciferol, Vitamin D ₃ , Calcitriol
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches 3,5 Adenosin-Monophosphat
CICP	Collagene Type I, c-terminal Propeptide
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	epidermal growth factor
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FSGS	fokale segmentale Glomerulosklerose
GH	growth hormone
GTP	Guanintriphosphat
IGF	insulin growth factor
IL	Interleukin
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
μM	Mikromol
MTT	Dimethylthiazol-diphenyl-tetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF	platelet derived growth factor
PTH	Parathormon
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

Knochenerkrankungen sind klinisch und pathophysiologisch komplexe Krankheitsbilder. Ihre Ursachen, die Entwicklung sowie Prävention und ihre Therapie werden intensiv erforscht. Die Osteoporose ist am häufigsten und gehört zu den hauptsächlichen Ursachen für Morbidität und Mortalität im fortgeschrittenen Alter. 75 Millionen Menschen allein in den USA, Europa und Japan leiden an Osteoporose (1). Somit ist die Osteoporose ein großes sozioökonomisches Problem. Nicht nur die Therapie von Altersosteoporose, sondern auch die Therapie von postmenopausalen Osteoporose und kortison-induzierter Osteoporose sowie von anderen seltener auftretenden Knochenkrankheiten wie M. Paget, Osteogenesis Imperfekta, Phosphatdiabetes und Tumorkrankheiten der Knochen beschäftigt die Forscher. Von hohem Wert ist bei vielen Knochenkrankheiten die Prävention durch richtige Ernährung und sportliche Aktivität. Bei erforderlicher Therapie sind Hormon- und Vitaminsubstitution sowie Fluorid- und Kalzitoninanwendung bekannte Behandlungsprinzipien.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den neuesten Medikamenten im Bereich der Therapie von Knochenerkrankungen, den Bisphosphonaten und ihrer möglichen Einwirkung auf humane Osteoblasten. Bisphosphonate werden in der Therapie von primärer und sekundärer Osteoporose, Tumorosteolysen, maligner Hyperkalziämie, M. Paget, Plasmozytom sowie Osteogenesis Imperfekta angewandt. Die individuellen Wirkungsmechanismen der Bisphosphonate sind noch zu untersuchen. Ein apoptotischer Effekt auf die Osteoklasten ist bekannt. Die klinischen Beobachtungen lassen mögliche direkte Einflüsse auf die Osteoblasten vermuten. Diese Zusammenhänge sind Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchung erfolgte an in vitro Zellkulturen.

1.1 Physiologie des Knochengewebes und Osteoblasten

Das Skelettsystem hat eine duale Funktion. Im Vordergrund für den menschlichen Organismus steht seine Stütz und Haltefunktion. Es dient aber auch, gemeinsam mit der Niere, der Kalzium- und Phosphatregulation und der Hämatopoese. Der geordnete Abbau von Knochen und der eng gekoppelte Aufbau ist für die normale Entwicklung, die biomechanischen Anpassungsmöglichkeiten und die ständige Erneuerung des Skelettsystems von entscheidender Bedeutung. Diese Funktion wird

durch die hochspezialisierten Knochenzellen aufrecht erhalten: die auf der Oberfläche des Knochens gelegenen Osteoklasten und Osteoblasten und die intraossären Osteozyten. Die Osteoklasten sind für die Knochenresorption und die beiden anderen für den Knochenaufbau zuständig.

Der Osteoklast ist eine mehrkernige Zelle, die aus der Granulozyten-Makrophagen Linie stammt (140). Er entsteht durch asynchrone Fusion mononukleärer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und befindet sich in den Howship-Resorptionslakunen (127). Der Osteoklast wird u.a. durch die Expression von Calcitoninrezeptoren, tartratresistenter saurer Phosphatase und vom Vitronectinrezeptor ($\alpha\beta 3$) charakterisiert. Sein apikaler, dem Knochen zugewandter Pol zeigt eine intensivere Anfärbung in der Peripherie (sealing-zone) und eine hellere, streifig und vakuolisierte zentrale Zone mit extrem gefalteter Zellmembran (ruffled-border). Im ruffled-border fusionieren Vesikeln mit lysosomalen Enzymen mit der Zellmembran. Dadurch werden die Enzyme ins Resorptionskompartiment freigesetzt. Zudem schafft der Osteoklast im ruffled-border durch vakuoläre Protonenpumpen ein saures Milieu. So lösen sich die Hydroxyapatitkristalle aus der kollagenen Knochenmatrix und die Kollagenfasern werden abgebaut (6).

Der Osteoblast stammt aus den Mesenchymstromazellen, die ursprünglich pluripotent sind und sich zu Muskel-, Fett-, Knorpel- oder Fibroblastenzellen entwickeln können. Es gibt eine Vorläuferzellenpopulation, die teilweise differenziert ist: der Präosteoblast, der sich weiterhin nur zum Osteoblast enddifferenzieren kann. Der Präosteoblast wird als determinierte osteogene Vorläuferzelle benannt und befindet sich im Periosteum und im Knochenmarkstroma (12, 83). Er entwickelt sich zunächst in den aktiven Osteoblast mit kubischer Zellform, später in den intermediären Osteoblast und schließlich in den terminalen "ruhenden" Osteoblast, der morphologisch abgeflacht ist (13, 166). Die meisten Osteoblasten bleiben entweder an der Knochenoberfläche als ruhende Osteoblasten (lining cells) oder erleiden einen vorprogrammierten Tod (Apoptose). Die ruhenden Osteoblasten besitzen im Vergleich zu den aktiven Osteoblasten beim Erwachsenen das zehnfache bis hundertfache der endostalen Knochenoberfläche und können jederzeit in aktiven Osteoblasten umwandeln. Zahlreiche interzelluläre Verbindungen im Sinne von "gap junctions" (123) existieren zwischen diesen Zellen. Hauptaufgabe der Osteoblasten ist die Knochenmatrixproduktion. Sobald die Produktion der kollagenen und nicht kollagenen Proteine vervollständigt ist, werden manche der Osteoblasten

von Matrix umgeben und sind als fixe Osteozyten im Knochen eingebettet (2). Die Osteozyten und die ruhenden Osteoblasten sind miteinander über das sogenannte lakuno-kanalikuläre System verbunden. Es sind kleine Matrixkanälchen, worüber Mineralien und verschiedenen Mediatoren während des Knochenumbaus ausgetauscht werden. Osteoblasten in vivo und in vitro werden durch die Produktion von alkalischer Phosphatase (71), Osteocalcin (112), Osteopontin, „bone sialoprotein“ und Kollagen charakterisiert. Sie besitzen Rezeptoren für Parathormon, Vitamin D, Glykokortikoide, Sexualhormone, Wachstumshormon, und Schilddrüsenhormone (122). Zudem besitzen sie Rezeptoren für Il-1, Il-6, TNF-alpha, Prostaglandine, IGF, TGF-beta, verschiedene BMPs, FGF, PDGF and VEGF (136).

Die Osteoblasten sind die aktiven Produzenten der Knochenmatrix. Diese besteht aus Kollagen sowie aus nicht kollagenen Proteinen. Im adulten menschlichen Knochen befindet sich fast ausschließlich Kollagen Typ I und in geringen Mengen Kollagen Typ III. Unter den nicht kollagenen Proteinen dominiert das knochenspezifische Osteocalcin. Andere Proteine wie Osteonectin, Osteopontin und „bone sialoprotein“ kommen hinzu. Sie bilden in extrazellulärem Raum das Osteoid. Es ist das organische Substrat, worauf die Mineralisation bzw. die Ablagerung von Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxyapatitkristallen erfolgt. Die Kristalle sind äußerst klein und beinhalten zusätzlich Karbonat, Fluorid und verschiedene Spurelementen. Die Mineralisation wird durch das Einbetten in Kollagenfasern eingeschränkt. Andere Substanzen der Knochenoberfläche wie z.B. Pyrophosphat hemmen ebenso die Mineralisation. In der Knochenmatrix finden sich zusätzlich kleine Proteoglykane, Plasmaproteine, Enzyme, Zytokine und Wachstumsfaktoren eingebettet (166).

1.2 Regulation des Auf- und Abbaus von Knochen.

Nachdem die Osteogenese sowie die desmale und chondrale Ossifikation des embryonalen präformierten hyalinknorpeligen Skelettes abgeschlossen sind, ist weiterhin der Knochen des erwachsenen Menschen einem ständigem Umbau. Dieses sogenannte „remodeling“ dient der Reparatur von Mikrofrakturen, der Anpassung auf die unterschiedlichen biomechanischen Kräfte, die täglich auf den Knochen ausgeübt werden sowie der regelrechten Erhaltung der Kalzium- und Phosphathomöostase. Die sogenannte „basic multicellular unit“ (BMU) besteht aus nebeneinander positionierten Osteoblasten und Osteoklasten. In dieser vollzieht sich

eine gleichwertige Stimulation der osteoklastischen Knochenresorption und der osteoblastischen Knochenformation. Als „coupling“ wird sowohl die zeitliche Abfolge beider Prozesse in den BMU als auch die Balance zwischen Resorptions- und Formationsrate bezeichnet. Dadurch wird die Stabilität der Knochenmasse gewährleistet. Für die komplexe Regulation sind eine Vielzahl von systemischen und lokalen Faktoren zuständig. Andere Organe, die miteinbezogen werden sind das endokrine System, die Niere und der Darm. Letztlich die Apoptose beider Zellen determiniert ihre Funktion und Lebensdauer (89, 110). Anti-Fas Antikörper und TNF sowie auch andere Zytokine, die sich in der Mikroumgebung des Knochens befinden, wirken apoptotisch auf die Osteoblasten. Il-6, TGF- β “, und das antiapoptotische Protein bcl-2 verhindern dagegen die Apoptose der ruhenden Osteoblasten und Osteozyten (90, 114).

Zu den systemischen Regulationsfaktoren des Knochenstoffwechsels gehören das Parathormon, das Vitamin D, die Sexualhormone, die Schilddrüsenhormone, das Calcitonin, aber auch diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren. Das Parathormon ist der wichtigste Regulator der Kalziumhomöostase. Es stimuliert die Knochenresorption sowie die renale Vitamin D-Produktion und erhöht die tubuläre Kalziumresorption. Bei regelmäßiger Applikation wird der Knochenaufbau angeregt, höhere Konzentrationen dagegen können die Kollagenproduktion hemmen. Östrogene beeinflussen in beiden Geschlechtern die Skelettentwicklung: In der späten Pubertät hemmen sie den Knochenabbau, reduzieren dadurch den Knochenumbau und regulieren den zeitgerechten Epiphysenschluss (24). Bei erwachsenen Frauen fördern Östrogene u.a. die Calcitoninfreisetzung aus der Schilddrüse. Ihre Reduktion während der Menopause führt zu einem Abfall des Serumcalcitonins, wodurch ihre hemmende Wirkung auf die Knochenresorption abnimmt (144). Östrogene und Parathormon weisen zudem einen indirekten Einfluss auf den Knochenabbau auf. Sie hemmen die Produktion von Interleukin-6, welches stimulierend auf die Entwicklung und Differenzierung der Osteoklastenprogenitoren wirkt (119). Vitamin D erhöht die intestinale Kalzium- und Phosphatresorption und unterstützt somit die Knochenmineralisation. Es beeinflusst aber auch direkt die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten. Calcitonin hat eine geringe physiologische Rolle, allerdings hemmt es in pharmakologischer Dosierung die Osteoklastenaktivität (143). Die Schilddrüsenhormone stimulieren sowohl Knochenab- als auch -aufbau. Beim Hyperthyreoidismus wird ein erhöhter

Knochenumbau beobachtet, der zum Knochenmassenverlust führen kann. Glukokortikoide haben stimulierende und hemmende Effekte auf Knochenzellen. In vitro sind sie essentiell für die Differenzierung von Osteoblasten und sensibilisieren die Knochenzellen gegenüber Regulationsfaktoren wie IGF-1 und PTH. Ihre langjährige Applikation verursacht Osteoporose.

Die lokale Regulation des Knochenstoffwechsels erfolgt durch innerhalb des Knochens produzierte und dort wirksame Faktoren, die autokrine und parakrine Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten haben können. Diese ortständigen Zytokine oder Wachstumsfaktoren sind teilweise in der Knochenmatrix miteingebettet und werden bei der Resorptionsphase freigesetzt. In den "gap junctions" zwischen den Osteoblasten, die eine epithelähnliche Struktur auf der Knochenoberfläche bilden, befinden sich die Connexine. Diese gehören zusammen mit den Cadherinen zu der Familie der Adhäsionsmoleküle und sind für die Regulierung von Osteoblastenfunktion und –formation zuständig (47). Osteoblasten sezernieren ferner osteolytischer Substanzen. In ihrem Zytoplasma befinden sich Kollagenasen (12). Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren werden von den Osteoblasten produziert und spielen eine vielfältige Rolle in der Knochenmikroumgebung. Der TNF, die Interleukine 1, 6, 8 und 11, der M-CSF, der TGF-beta, der EGF stimulieren die Osteoklasten und Präosteoklasten und somit den Knochenabbau. Die BMP, das beta 2 - Mikroglobulin, der TGF alpha, PDGF, FGF, Il-1a, GH und IGF stimulieren die Osteoblasten und somit den Knochenanbau. Die in vitro Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die Knochenzellen stellt sich schwierig dar. Der TGF-beta in geringen Dosen (pg) inhibiert die osteoblastäre Differenzierung im Sinne der Produktion von alkalischer Phosphatase und vom cAMP-Anstieg nach PTH Stimulation bei einer osteoblastischen Zelllinie (40). Allerdings in höheren Dosen (ng) konnte eine Induktion der Osteoblastenproliferation nachgewiesen werden (146).

Eine Menge anderer Faktoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Stickstoffmonoxid sind von großer Bedeutung, für die schnelle zelluläre Antwort der Knochenzellen auf Entzündung oder mechanischen Reiz. Stickstoffmonoxid gehört zu den Molekülen, die von den Osteoblasten produziert wird und direkt die Osteoklastenaktivität und –formation hemmt. Die konstitutiven niedrigen Konzentrationen von NO fördern Osteoblastenproliferation und modulieren Osteoblastenfunktion, höhere Konzentrationen wirken hemmend auf Osteoblasten

(41). Leukotriene, die in Mäuseschädel injiziert wurden haben die Knochenresorption, die Anzahl von Osteoklasten und der erodierten Oberflächen signifikant erhöht. Garcia et al behaupten, dass Leukotriene die Knochenresorption teils durch ihre stimulierende Wirkung auf die Osteoklastenformation stimulieren (63).

Hofbauer et al 2000 haben einen eleganten Regulationsmechanismus der Osteoklastogenese vorgestellt, indem sie das letzte Glied der Wirkungskette vieler Hormone und Zytokine auf Osteoklasten beschrieben haben. Es handelt sich um den Osteoprotegerin-Ligand/Osteoklast Differenzierungsfaktor (OPG-L/ODF), der von Osteoblasten produziert wird und sich an seinen Rezeptor, den Osteoklast-Differenzierungs- und Aktivierungs-Rezeptor (ODAR) bindet. OPG-L/ODF stimuliert die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten, steigert die Aktivität der reifen Osteoklasten und hindert deren Apoptose (85).

1.3. Knochenerkrankungen und Medikamente

Während des ganzen Lebens des Menschen findet ein physiologischer Knochenumbau, der sich in einem feinregulierten Gleichgewicht befindet, statt. Bis zum 30. - 40. Lebensjahr des Menschen nimmt die Gesamtknochenmasse zu und erreicht dann ihren Maximalwert ("peak bone mass"). Anschließend fängt der Alterungsprozess an, der zu einem allmählichen Verlust an Knochenmasse aufgrund der vermehrten Knochenabbaurate im Vergleich zur Knochenneubildung führt. Der Verlust betrifft beide Knochenarten; die Spongiosa mehr als die Kortikalis. Während ihres Leben verlieren Männer 20-30 % der peak bone mass und Frauen 30-40 %. Noch leidet aber der Mensch nicht an Knochenfrakturen. Die Grenze zwischen diesem altersassoziierten Knochenmassenverlust, bezeichnet als Osteopenie, und der manifesten Osteoporose mit Frakturen, Schmerzen und Minderung der Körpergröße ist fließend. Die Fraktureninzidenz steigt wegen einer Änderung der Architektur des Knochens mit Verminderung und eventuell Verlust der Trabekeln (92). Es existieren viele Definitionen der Osteoporose: Die WHO definiert als Osteoporose die Verminderung des Knochenmineralgehaltes beim Patient über 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Referenzdurchschnittes der jungen Erwachsenen (- 2,5 T-scores) (94). Beim Auftritt von Frakturen wird die Krankheit als schwere Osteoporose bezeichnet. Zur Prävention der Osteoporose ist die peak bone mass von großer Bedeutung; je höher sie ist, desto weniger Konsequenzen wird der unvermeidliche Knochenverlust für die Knochenarchitektur haben. Die Höhe der

peak bone mass ist von genetischen Faktoren u.a. Vit D-Rezeptor Gene, von der Ernährung und von den Lebensgewohnheiten abhängig (74). Durch die Verlängerung der Lebenserwartung steigt auch die Inzidenz der Osteoporose. Man unterscheidet zwischen idiopathischer, postmenopausaler, seniler und sekundärer Osteoporose (149). Bei postmenopausalen Frauen dient zusätzlich zu der „normalen“ Altersosteopenie die abrupte Östrogeneminderung einem rapiden Knochenmasseverlust. Die Krankheit ist häufiger bei Frauen der weißen und asiatischen Rasse. Die sekundäre Osteoporose kommt als Folge anderer Erkrankungen, wie Hyperkortikosteroidismus oder therapeutischer Anwendung von Kortikosteroiden, Hyperthyreoidismus, Hypogonadismus, primärer oder sekundärer Hyperparathyreoidismus, Leber- und Tumorerkrankungen oder Immobilisation zustande. Heutzutage ist sie die häufigste Knochenerkrankung. 200 Millionen Patienten leiden weltweit darunter (31). Allein in den Vereinigten Staaten im Jahr 1995 betragen die Kosten für die Behandlung osteoporotischer Frakturen 13,8 Milliarden Dollar. Entsprechend entwickelt sich die Krankheit zu einem großen medizinischen und sozialökonomischen Problem. Die Entwicklung effektiver Strategien zur Prävention, frühzeitige Diagnose und Behandlung ist ein wichtiges zukünftiges Ziel.

Morbus Paget (Osteitis deformans) ist charakterisiert durch einen vermehrten Knochenabbau. Ein pathogenetischer Zusammenhang mit einer Paramyxovireninfektion (124) sowie auch eine genetische Komponente mit einem verdächtigen Locus auf Chromosom 18 werden diskutiert (79). Es entsteht eine erhöhte Il-6 Produktion von Knochen- und Knochenmarkzellen, die einen erhöhten Knochenabbau mit entsprechenden osteolytischen Läsionen verursacht. Daraufhin erhöht sich sekundär der Knochenaufbau, der für abnormale sklerotische Läsionen und lokale Skelettdeformierungen verantwortlich ist. Es entsteht ein Mosaikmuster im Lamellenknochen mit erhöhter Vaskularisation und vermehrtem Bindegewebe am naheliegenden Knochenmark. 5 % der Patienten haben eine deutliche klinische Symptomatik mit Knochen- und Gelenkschmerz, Frakturen und Deformierungen. Weniger als 1 % der Patienten entwickeln Osteosarkome. Morbus Paget hat eine höhere Prävalenz in Europa außerhalb von Skandinavien; ungefähr 3 % der Population der über 50-jährigen ist betroffen (52).

Das Krankheitsbild der Osteomalazie beschreibt eine Dysfunktion bei der Mineralisation der Knochenmatrix. Ursachen dafür können Vitamin-D-Mangel bei

Niereninsuffizienz (67), Malnutrition oder Malabsorption (11, 65), Hypophosphatämie beim primären tubulären Phosphatverlust, oder bei X-assoziiertes hypophosphatämischer Rachitis (158), Tumorkrankheit der Knochen (98) oder Funktionsstörungen der Knochenmatrix wie z. B. verminderter Serum- und Skelettgehalt an alkalischer Phosphatase sein.

Funktionsstörungen der Knochenmatrix sind auch die Ursache für die Osteogenesis Imperfekta (70).

Weitere große therapeutische Probleme sind die tumorbedingte Hyperkalziämie sowie die metastasenbedingten Osteolysen. 1948 beschreibt Walther, dass der Knochen ist das Organ, das am dritthäufigsten nach Lunge und Leber von distalen Metastasen betroffen ist. Die häufigsten Primärtumoren, die in den Knochen metastasieren, sind Prostata- und Mammakarzinom. Als osteolytische Tumorerkrankung wird die Knochendestruktion bezeichnet, die durch entweder lokale Tumorzellinvasion, oder durch Knochenabbau induzierende Faktoren, die vom Primärtumor in das Blut ausgeschüttet werden, verursacht wird. Unterschiedliche Theorien erläutern die Metastasenmechanismen. Paget 1889 stellte die „seed and soil“ Theorie auf. Gemäß dieser Theorie werden Wachstumsfaktoren von den Osteoblasten in der Knochenmatrix eingebettet. Diese stellen eine fertile Mikroumgebung für die Kolonisation der metastasierenden Tumorzellen dar.

Des weiteren exprimieren Tumorzellen Zytokine, die den Knochenabbau induzieren wie das PTH-related Peptid, TGF- α , TNF, M-CSF, Prostaglandine, Il-1 und Il-6 sowie Adhäsionsmoleküle, die an der Entstehung von Metastasen beteiligt sind. Zu diesen gehören die Cadherine, kalziumabhängige Adhäsionsmoleküle, die die Zell-zu-Zell Interaktionen regeln und eine Schlüsselrolle in der Zelldifferenzierung spielen; die Intergrine, die die Adhäsion zwischen Matrix und Zelle vermitteln; die Selektine, die Metalloproteinasen u.a.. Es gibt osteoblastische und osteoklastische Knochenmetastasen. Prostatakarzinommetastasen sind osteoblastisch, die des Mammakarzinoms sind meistens osteolytisch. Knochenmetastasen kommen häufiger bei Lungen-, Mamma-, Prostata-, Ovarial-, Nieren- und Hirnkarzinome sowie bei hämatologischen Neoplasien vor, hier vor allem beim multiplen Myelom.

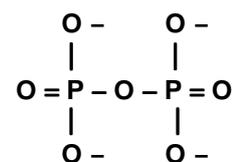
Verschiedene Medikamente werden in der Therapie der Knochenerkrankungen eingesetzt. Östrogene stoppen im Falle der postmenopausalen Osteoporose den Abbau von Knochenmasse und senken somit die Frakturhäufigkeit. Den selben

Effekt erreicht Calcitonin. Bei der Anwendung beider Medikamente ist jedoch fraglich ob die verlorene Knochenmasse wiederaufgebaut wird. Die Fluoridtherapie führt zwar zu einem Knochenaufbau, die Festigkeit des Knochens scheint aber von geringer Qualität zu sein (103). Auf der anderen Seite zeigten Baylink et al 1998 in einem in vitro Modell, dass Fluorid (mit optimaler Dosis von 10 µM) sowohl die Proliferation von Osteoblasten als auch ihre Differenzierung, im Sinne einer vermehrten Produktion von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und Kollagen stimuliert (100). Weiterhin werden in der Therapie der Osteoporose oder Osteopenie Kalzium und Vitamin D substituiert, sowie Parathormonfragmente und Bisphosphonate eingesetzt. Die neuesten therapeutischen Ansätze, wie Substitution von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind jedoch noch zu erproben. Zur Diskussion kommt auch die lokale Anwendung von BMP als medikamentöse Unterstützung bei Knochenfrakturen oder Gelenkersatzoperationen (33, 179). Ein andere therapeutischer Ansatz ist der von Parathormon. PTH kann intermittierend, allein oder in Kombination mit knochenbildungsstimulierenden Faktoren appliziert werden (61, 120).

1.4. Bisphosphonate

Bisphosphonate sind synthetisch hergestellte stabile Strukturanaloga des anorganischen Pyrophosphats, dessen Eigenschaften schon Anfang des Jahrhunderts bekannt waren (50).

Das Pyrophosphat ist eine im Urin und Plasma physiologisch vorkommende Substanz. Es dient der Hemmung der Kalziumphosphatpräzipitation und ist somit ein endogener Regulator der Knochenmineralisation (159). In vivo bindet es sich stark an Kalziumphosphat und reduziert dessen



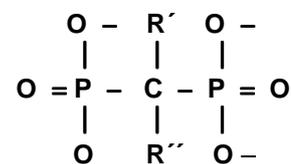
Pyrophosphat

Kristallisation, schützt bei intravenöser Anwendung vor ektopischer Kalzifikation, hat aber keinen Effekt auf die Knochenresorption. Seine lokale Knochenkonzentration wird vermutlich durch die verschiedenen lokalen Knochenpyrophosphatasen geregelt. Heutzutage kommen im medizinischen Bereich Pyrophosphate in der Szintigraphie und in Zahnpasten als Antiplaquekomponente zum Einsatz.

Da die Phosphor-Sauerstoff-Bindungen des Pyrophosphats leicht enzymatisch und hydrolytisch spaltbar sind, ist seine orale therapeutische Anwendung nicht möglich. Die Entwicklung einer stabilen Substanz mit ähnlichen Eigenschaften war

erwünscht und gelang durch den Ersatz des Sauerstoffatoms der instabilen P–O–P Bindung durch ein Kohlenstoffatom (P–C–P). Die neue synthetische Substanz, gewann an Stabilität gegen Hitze, chemische Reagenzien und vor allem gegen enzymatische Hydrolyse (48).

Die physikochemischen Eigenschaften der meisten Bisphosphonate ähneln denen der Pyrophosphate. Sie weisen eine starke Affinität zu Metallionen auf und bilden lösliche und unlösliche Komplexe und Aggregate. Die Stärke der Reaktion ist vom pH der Lösung und vom Metall abhängig. Bisphosphonate weisen eine dreidimensionale



Bisphosphonat

Struktur auf. Diese dreizählige Konformation des Bisphosphonatmoleküls ermöglicht deren Bindung an Metallionen wie Kalzium, Magnesium und Eisen und an Oberfläche die Kalzium bzw. Kalziumphosphat beinhalten. Somit wird die Präzipitation des letzteren gehemmt und seine Aggregation zu größeren Kristallkomplexen gehemmt (58, 77). Weiterhin hemmen sie die Auflösung der Apatitkristalle (159). Die Kalziumaffinität steigt, wenn die Seitenketten des Bisphosphonatmoleküls eine Hydroxyl- oder eine Aminogruppe haben.

Die biologischen Eigenschaften der Bisphosphonate wurden sowohl in vitro als auch in vivo untersucht. In vitro hemmen sie die Knochenresorption. In Kulturen von Osteoklasten auf mineralisierter Matrix werden die Resorptionslakunen reduziert. In Organkulturen langer Knochen oder Schädel von embryonalen Ratten wird der Knochenabbau vermindert. In wachsenden Ratten verhindern Bisphosphonate den Knochenumbau der Metaphyse, so dass in der Röntgenaufnahme ein ähnliches Bild wie bei Tieren mit angeborener Osteopetrose beobachtet wird (164). Die Hemmung der Knochenresorption wurde ferner durch eine Kinetikstudie mit ⁴⁵Ca und durch Messungen der Hydroxyprolinausscheidung belegt (8). Ein vorläufiges Phänomen bei der Behandlung mit Bisphosphonaten ist die Erhöhung des Kalziums im Plasma. Dies ist bedingt durch die Erhöhung des Vitamin D, die als Antwort auf den reduzierten Knochenabbau erfolgt und eine erhöhte Kalziumabsorption im Darm verursacht. Dadurch dass Bisphosphonate hemmend auf den Knochenabbau wirken, reduzieren sie den gesamten Knochenmetabolismus. Aufgrund dessen steigt die Gefahr eines Knochenbruchs bei der längeren Anwendung von z. B. Etidronat, die zu einer Osteomalazie führt (153, 171).

1.4.1 Pharmakologie

Unser aktuelles Wissen über Bisphosphonate stammt zum größten Teil aus den letzten 30 Jahren, obwohl das erste Bisphosphonat, Etidronat, schon 1897 von deutschen Chemikern produziert wurde (51).

Ihre Molekularstruktur ermöglicht sämtliche Variationen der zwei Reste (R' - und R''), die Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Halogen-, Sulfur- oder Stickstoffatome tragen sowie Ketten oder Ringe beinhalten können. Hierdurch entstehen viele Bisphosphonate mit individuellen physikochemischen und biologischen Charakteristika und Wirkungspotential. Ziel der pharmakologischen Forschung ist Bisphosphonate mit stärkerer antiresorptiver Aktivität, aber ohne zunehmende Hemmung der Mineralisation (48) zu entwickeln. Folgende strukturelle Variationen des Moleküls bewirken ein zunehmendes Wirkungspotential:

- 1.) Das Einbauen einer Aminogruppe am Ende der seitlichen Kette (R), wie z. B. bei Pamidronat. (145)
- 2.) Eine zusätzliche Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 1 steigert die antiresorptive Aktivität (169)
- 3.) Die zunehmende Länge der aliphatischen Kohlenstoffatomkette mit einem maximalen Effekt bei vier Kohlenstoffatomen, wie bei Alendronat (163)
- 4.) Das Einbauen einer Methyl- oder einer Penthylgruppe am Stickstoffatom (siehe 1), wie bei Ibandronat (126)
- 5.) Zyklische Bisphosphonate vor allem diese mit einem Stickstoffatom im Ring, wie Risendronat oder mit einem Imidazolring wie Zolendronat (170).

Ebenso scheint die dreidimensionale Struktur des Moleküls das Wirkungspotential des Medikamentes zu beeinflussen, da stereoisomere Aktivitätsunterschiede aufweisen. In der folgenden Tabelle wird die antiresorptive Potenz der verschiedenen Bisphosphonate im Rattenmodell gezeigt (47). Das bei den Ratten evaluierte Potential entspricht gut den Beobachtungen nach Bisphosphonat-anwendungen beim Menschen (52).

Bisphosphonate	Relative Aktivität
Etidronat	1x
Clondronat Tiludronat	10x
Neridronat Pamidronat	100x
Alendronat EB -1053 Incadronat Olpadronat	>100x - <1000x
Risendronat Ibandronat	>1000x - <10000x
Minodronat Zoledronat	>10000x

Die Wirkungsmechanismen der Bisphosphonate sind zellulär und betreffen hauptsächlich Osteoklasten und die Mineralisation der Knochenmatrix. Die an den Hydroxyapatitkristallen der Matrixoberfläche gebundenen Bisphosphonate werden von den Osteoklasten zusammen mit der Matrix phagozytiert. Dabei unterliegt der Osteoklast bestimmten Morphologie- und Funktionsänderungen. Das Zytoskelett ändert sich und die Anzahl der „ruffled borders“ wird reduziert. Eine verminderte Produktion von Laktat Säure, Protonen und Protonen-ATPase unter den „ruffled borders“ wird beobachtet. Diese Änderungen reduzieren zum einen die Knochenabbaufähigkeit der Osteoklasten und zum anderen können zu ihrer Apoptose führen. Mit Bisphosphonaten behandelte Osteoklasten wurden in einem zweiten Schritt auf mineralisierte Substrate gegeben. Dieses führte zu einer verminderten Anzahl der Resorptionslakunen, was einer reduzierten Knochenabbaufähigkeit entspricht und für einen intrazellulären Wirkungsmechanismus der Medikamente auf die Osteoklasten spricht (20, 101).

Rogers et al konnten die apoptotische Wirkung der stickstoffhaltigen Bisphosphonate durch ihren inhibitorischen Einfluß auf den Stoffwechselweg der Mevalonsäure erklären (155). Mevalonsäure ist ein Zwischenprodukt in der Cholesterinsynthese. Unter dem Einfluss einer Phosphatkinase entsteht das Mevalonsäure-5-pyrophosphat, welches durch eine Decarboxylase in Isoprenylpyrophosphat (Isopentenylpyrophosphat) übergeht. Diese „Prenylierung“ ist

ein notwendiger Schritt für die Verankerung diverser GTP-asen, wie z.B. Rho, Rac, cdc42 und Rab, die für die Osteoklastenfunktion essentiell sind, an den Zellmembranen. Die Hemmung der „Prenylierung“ führt zur Dysregulation intrazellulärer Abläufe, welche die Zellmorphologie, die Intergrinesignale, die Bildung der „ruffled borders“, die intrazelluläre Zirkulation der Endosome und die Apoptose betreffen. Ein hemmender Effekt der stickstoffhaltigen Bisphosphonate auf die Cholesterolsynthese wurde auch in den J774 Mausmakrophagen beschrieben (5).

Ein anderer Wirkungsmechanismus wird für die nicht stickstoffhaltigen Bisphosphonate vermutet. Aufgrund der chemischen Verwandtschaft zu Pyrophosphat werden nicht stickstoffhaltige Bisphosphonate wie z. B. Clodronat, Etidronat und Tiludronat mit in Nukleotidanaloga eingebaut, konsekutiv sind diese nicht mehr hydrolysisierbar. Sie akkumulieren intrazellulär, wirken somit toxisch, hemmen die Osteoklastenfunktion und verursachen ebenso deren Apoptose (60, 135, 156).

Patienten, die langfristig mit Bisphosphonaten behandelt wurden, weisen eine dramatische Reduktion der Osteoklasten auf. Aufgrund dessen postulieren Loewik et al einen hemmenden Effekt der Bisphosphonate auf die Rekrutierung der jungen Osteoklasten (108).

Ein direkter Effekt der Bisphosphonate auf Osteoblasten wird ebenso diskutiert. Es wird vermutet, dass Osteoblasten ein Protein unter Bisphosphonateinfluss produzieren, das die Rekrutierung von Osteoklasten hemmt (181).

Bisphosphonate beeinflussen die Knochenmineralisation. Der nach Bisphosphonatbehandlung entstandene Knochen weist eine bessere biomechanische Qualität auf. Bei der Arthritis wurde beobachtet, dass Bisphosphonate lokal die Knochen- und Knorpelresorption hemmen und somit die Gelenkarchitektur erhalten. Zudem reduzieren sie die entzündliche Reaktion (47).

Bisphosphonate wirken aber nicht nur auf Knochenzellen. Pecherstorfer et al 2000 zeigten eine Reduktion der zirkulierenden Lymphozyten-Subpopulation durch Bisphosphonatbehandlung. Diese ist am ehesten durch vermehrte TNF-alpha-Produktion bedingt, die die Adhäsion dieser Zellen an den Endothelien fördert (134). Aktivität und Proliferation der Makrophagen in vitro werden gehemmt; Zellen des Bindegewebes sprechen auf Bisphosphonatbehandlung an. In vivo hemmen sie die ektopische Kalzifikation sowie die Kalzifikation von Nieren, Haut und Arterien, indem

sie die Akkumulation von Cholesterol, Elastin und Kollagen auf den Arterienwänden hemmen (53).

Die Bisphosphonate werden im Magen und hauptsächlich im ersten Teil des Dünndarms wahrscheinlich mittels Diffusion absorbiert. Die gleichzeitige Einnahme mit dem Essen, vor allem mit Milch oder anderen Produkte, die Kalzium oder Eisen beinhalten, vermindert dramatisch ihre Bioverfügbarkeit. 20-80%, des absorbierten Medikaments, abhängig vom Alter, Geschlecht, Spezies und Wirkungspotential, wird an die Knochenmatrix gebunden. Der Rest wird unverändert renal eliminiert. Im Blut sind die Bisphosphonate an Proteine, besonders Albumin gebunden, oder sie bilden kleine Aggregate. Deswegen ist bei der intravenösen Gabe Vorsicht geboten: schnelle Gabe größerer Mengen führt zu Bildung von Aggregaten, die zum einen von Makrophagen phagozytiert werden und somit eine „akute Phase Reaktion“ hervorrufen und zum anderen Nierenversagen verursachen können. Zudem kann es auch zu symptomatischer Hypokalziämie kommen. Die Halbwertszeit der zirkulierenden Bisphosphonate ist besonders kurz und beträgt beim Menschen nur 0,5–2h. Dieses ist die Folge ihrer starken Affinität zu den Kalziumkarbonatkristallen. Sie binden sich an die Hydroxyapatitkristalle der Matrixoberfläche und verlassen so rasch das Blut. Das effektive Niveau wird schnell erreicht und ist dosisabhängig, wobei die Sättigung der Akkumulation im Skelett erst nach Jahrzehnten chronischer Anwendung erreicht werden kann. Die Bisphosphonate werden mit der Zeit in der Knochenmatrix eingebettet und bleiben vielleicht lebenslang im Skelett (49). Das Einbetten inaktiviert sie. Jedoch werden sie reaktiviert, sobald Osteoklasten zum Zwecke des Knochenumbaus Knochenmatrix phagozytieren. Sato M et al haben gezeigt, dass die Bindung von Alendronat an den Knochen ca. 105 nmol/mg Knochentrockensubstanz beträgt (161).

In Tierexperimenten wurden keine Mitogenese, Karzinogenese oder Teratogenese durch Bisphosphonate nachgewiesen. In der klinischen Anwendung wird gelegentlich eine Hypokalziämie direkt nach der intravenösen Gabe beobachtet, die mit intravenöser Kalziumgabe schnell zu korrigieren ist. Weitere Nebenwirkungen sind akutes Nierenversagen Pamidronat und FSGS und gastrointestinale Beschwerden bis zur akuten Gastritis und Ösophagitis. Diese können vermieden werden, wenn die orale Aufnahme der Medikamente von ausreichender Flüssigkeitseinnahme begleitet wird. Es sollte ferner erwähnt werden, dass einige Bisphosphonate wie Etidronat und Pamidronat plazentagängig sind (73).

Die chronische Toxizität von Bisphosphonaten in therapeutischer Dosierung ist gering. Bei hochdosiertem Einsatz niedrigpotenter Bisphosphonate, vor allem bei kontinuierlicher Applikation, kann es zu einer Osteomalazie kommen; bedingt durch eine konsekutiv verminderte Osteoblastenfunktion und einen niedrigeren Knochenumsatz aufgrund der Osteoklastenhemmung.

1.4.2 Klinische Anwendung

Bisphosphonate haben sehr viele Anwendungen in der Klinik gefunden und bieten Erfolg in der Behandlung vieler Knochenerkrankungen. Ihre Dosierung und Therapiedauer sind vom jeweiligen Bisphosphonat, seiner pharmakologischen Potenz und der grundlegenden Erkrankung abhängig. Je nach Indikation können sie oral über 3-6 Monate oder intravenös einmalig (z. B. Ibandronat oder Zolendronat) oder über 5-10 Tage angewandt werden. Die Länge der Therapie und die Wiederholung des Zyklus soll individuell bei jedem Patient je nach Verlauf der biochemischen Marker (knochenspezifische alkalische Phosphatase und Osteocalcin im Serum, Hydroxyproline und Pyridoline crosslings im Urin) und der Klinik entschieden werden.

Bisphosphonate sind bei allen metabolischen Knochenerkrankungen mit gesteigerter Osteoklastenaktivität indiziert. Am Anfang war ihre Anwendung auf M. Paget und tumorassoziierte Hyperkalziämie beschränkt. In den letzten Jahren werden sie in der Therapie der kortikosteroid-induzierten und der postmenopausalen Osteoporose sowie der Schmerztherapie bei Knochenmetastasen effektiv eingesetzt. Manche pädiatrischen Zentren benutzen Bisphosphonate in der Therapie der Osteogenesis Imperfecta (69). Aktuell wird ihre Anwendung als Prophylaxe vor Knochenmetastasen bei Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinom diskutiert (36).

Nach Bisphosphonatbehandlung bei Patienten mit M. Paget hat man bemerkenswerter Weise eine regelrechte Lamellenstruktur des neuen Knochens im Gegensatz zu der hohlen Struktur des erkrankten Knochens beobachtet. Calcitonin und Plicamycin werden ebenso bei M. Paget angewandt, allerdings ohne denselben Erfolg.

Ein anspruchsvolles therapeutisches Problem sind die Knochenneoplasien, die von Schmerzen, Frakturen und eine therapieresistente Hyperkalziämie. Forcierte Diurese, Rehydrierung und Plikamycin (Mythramycin) sind die gängigen

Therapiestrategien (32). Plikamycin wird heutzutage wegen der Leber-, Nieren- und Knochenmarktoxizität wenig benutzt. Die Mechanismen der malignen Hyperkalziämie sind der lokale und generalisierte Knochenabbau, der Kalzium ins Blut freisetzt, die erhöhte tubuläre Kalziumresorption als Folge der Wirkung der verschiedenen vom Tumor produzierten Faktoren, überwiegend des PTH-related Peptides, und die Dehydratation, die häufig bei Tumorpatienten vorkommt. Die Wirkung der Bisphosphonate wird an Stellen eines vermehrten Knochenumbaus verstärkt, weswegen sie in Fällen von Tumorhyperkalziämie einen therapeutischen Effekt haben. Nach 2-3 Tagen intravenöser Anwendung ist eine erste Reduktion des Serumkalziums zu sehen, Normokalziämie wird in ungefähr eine Woche erreicht. Wie lang dieser Effekt anhält, ist von vielen Faktoren abhängig. Eine Remission kann von ein paar Tagen bis zu einem Monat oder länger dauern. Eine Wiederholung der Therapie bewirkt meistens gute Ergebnisse. Auch bei der Hyperkalziurie, die fast ausschließlich Folge des erhöhten Knochenabbaus ist, zeigt die Bisphosphonatbehandlung gute Ergebnisse.

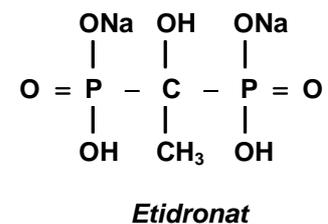
In einer weiteren experimentellen Arbeit lässt sich nachweisen, dass Bisphosphonate sowohl den lokalen Knochenabbau durch Tumor, als auch die Adhäsion und Ausbreitung der Tumorzellen hemmen (111). Dies ist möglicherweise auf den Einfluss der Medikamente auf die lokale Cytokinproduktion zurückzuführen.

Ein neuer interessanter pharmakologischer Aspekt ist die Herstellung von Konjugaten aus Bisphosphonaten und Chemostatika (z. B. Methotrexat) (86).

Einer der hauptsächlichen Anwendungen von Bisphosphonaten ist die Therapie der Osteoporose. Zur Therapie der Osteoporose werden Östrogene, Calcitonin, Fluorid, Kalzium und Vitamin-D sowie Bisphosphonate eingesetzt. Bislang erwies sich die Behandlung mit Bisphosphonaten effektiv hinsichtlich der Verhinderung eines weiteren Knochenabbaus. Bei der Anwendung an gesunden und osteoporotischen postmenopausalen Frauen wurde bei beiden Gruppen eine Erhöhung der Knochendichte am gesamten Skelett beobachtet. Der prophylaktische Einsatz wird deswegen stark diskutiert. Bisphosphonate können in Zyklen von 2-3 Monaten bis zu 7 Jahren verabreicht werden. Zur Beobachtung des Effektes können die verschiedenen biochemischen Marker bestimmt werden. Der Effekt ist ungefähr 2 Jahre nach der Therapie zu messen (66).

1.4.3 Etidronat

Etidronat ist das Dinatriumsalz der Etidronsäure (1-Hydroxyethyliden-1,1-Bisphosphonatsäure, EHDP). Es gehört zu den Bisphosphonaten der ersten Generation. Seine Summenformel ist $C_2H_6Na_2O_7P_2$ und sein Molekulargewicht 249.99.



Das Medikament wird oral und intravenös verabreicht. Das Therapieschema ist abhängig von der Grunderkrankung und die Ansprechbarkeit des Patienten. Empfohlene Dosierungen z. B. beim M. Paget sind 5 oder 10 mg / kg KG per os täglich für maximal 6 Monate oder 20 mg / kg KG per os täglich einen Monat lang.

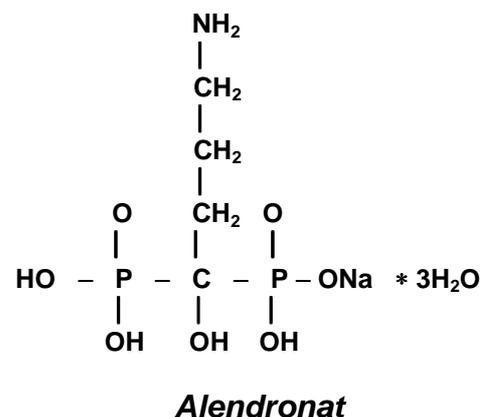
Etidronat ist das älteste Bisphosphonat. Seine einfache chemische Struktur gewährleistet weder große Potenz noch optimale Knochenmineralisation. Langfristige Einnahme von Etidronat kann Osteomalazie oder bei noch wachsendem Knochen Rachitis (47) verursachen.

Das Medikament ist in Deutschland für die Osteoporosetherapie zugelassen, sollte aber nicht länger als 6 Monate appliziert werden.

1.4.4 Alendronat

Alendronat ist das Mononatriumtrihydratsalz der (4-Amino-1-Hydroxybutylyden)-Bisphosphonatsäure. Seine Summenformel ist $C_4H_{12}NNaO_7P_2 \cdot 3H_2O$ und sein Molekulargewicht 325.1.

Das Medikament wird oral verabreicht. Es ist in Deutschland für die Therapie von Osteoporose zugelassen. Empfohlene Dosierungen sind 5mg per os als



Osteoporoseprophylaxe und 10 mg per os täglich als Osteoporosetherapie sechs Monate lang. An einer randomisierten Studie nahmen 2027 Frauen im Alter zwischen 55 und 81 Jahren, die an Osteoporose mit Wirbelsäulenfrakturen erkrankt waren, teil. Die Hälfte wurde mit 5 mg/die oral behandelt; nach einem Jahr wurde die orale Dosierung auf 10 mg/die gesteigert. Die andere Hälfte erhielt Placebo. Das follow-up dauerte 2,9 Jahren. In diesem Zeitraum wies die behandelte Gruppe versus

Das Medikament wird intravenös verabreicht und ist in Deutschland für die Behandlung von Knochenmetastasen und der malignen Hyperkalziämie, sowie der Osteoporose und des M. Paget zugelassen (37).

Ibandronat wird einmalig intravenös 2-6 mg, je nach Studie, verabreicht. Es zeigt ein deutlich höheres Potential verglichen mit Etidronat oder Alendronat, die z. B. wiederholte Applikation für das Erreichen der Normokalziämie voraussetzen.

J.D. Ringe et al haben 75 Patienten mit kortikosteroidinduzierter Osteoporose mit 2mg Ibandronat intravenös alle 3 Monate oder mit 1-Alphaalcalcidol behandelt. Die Patienten wurden 24 Monate beobachtet und gaben alle eine Linderung der Rückenschmerzen an. 11,8% hatten einen Anstieg der Knochendichte der Lumbalwirbelsäule in der Ibandronatgruppe messbar, im Vergleich zu nur 1,8% in der 1-Alphaalcalcidol Gruppe (148).

1.5 Zellkulturmodelle

Die Möglichkeit das Verhalten von Gewebe außerhalb des Körpers zu beobachten hat seit mindestens 100 Jahren die Wissenschaftler interessiert. Erst ist die Isolation von Gewebe gelungen, später die von Tumorzellen und zuletzt gelang die Isolation von normalen Zellen. Earle et al entwickelten 1943 erstmals kontinuierlich wachsende Mausfibroblasten. 1955 stellte Eagle das erste definierte Medium zusammen. Die Gefäße, in denen die Zellen in Medium wuchsen, waren aus Glas. Seit Ende der 70-Jahren erfolgt die Anzucht von Zellen in mit einer hydrophoben Oberfläche beschichteten Polystyrol-Einmalgefäßen. Serum im Medium wurde lange Zeit als notwendig angesehen, da es essentielle Hormone und Nährstoffe enthält. Physiologisch ist im engeren Sinne das Wachstum im serumhaltige Medium jedoch nicht, denn normales Gewebe oder Tumore stehen nicht mit koaguliertem Plasma in Kontakt. Zudem ist das Wachstum im serumhaltigen Medium hinsichtlich seiner Inhaltsstoffe wenig standardisierbar, so gerade Ergebnisse zur Beurteilung vom Hormon-, Wachstumsfaktoren oder Zytokineinfluss mit großem Vorbehalt interpretiert werden müssen. Mittlerweile ist es möglich Zellen in serumfreiem Medium zu züchten (97). Eine Charakterisierung der kultivierten Zellen über Chromosomenanalyse sowie über eine Untersuchung der Produktion deren charakterischen Proteinen im Zelllysat oder im Kulturmedium ist erforderlich.

Zellkulturen kommen als das kleinste zellbiologisch kontrollierbare Modell zur Anwendung, gerade wenn Fragestellungen über die Wirkung einzelner Substanzen auf bestimmte Zellen vorliegen. Diese sind durch in vivo Experimente naturgemäß nicht hinreichend genau zu klären, wegen der Vielzahl der Einflussfaktoren auf die zu testende Zellpopulation in einem komplexen Organismus.

1.5.1 Humane Osteosarkomzellkulturen

Humane Osteosarkomzellkulturen sind seit vielen Jahren Gegenstand von Zellkulturexperimenten. Ihre Isolierung aus dem Tumorgewebe und Etablierung als Monolayerkulturen erfolgt nach Spülung, Gewebedisektion, enzymatischer Zellseparation und Zentrifugation. Nach weiterer Subkultivierung erhält man homogene Zellpopulationen, welche ihre funktionellen Eigenschaften auch über längere Kultur- und Passagezeiträume hinweg behalten. Das rasche Zellwachstum führt schnell zum Erreichen höherer Zelldichten, die nachweisbare Substanzmengen produzieren. Nachteilig hierbei ist jedoch die Tatsache, dass Osteosarkomzellen ein transformiertes Genom besitzen und sich daher grundsätzlich in ihrer physiologischen Eigenschaften von normalen Knochenzellen unterscheiden können. Hierunter fällt auch ein Verlust der Kontrolle des Zellwachstums. Die Eigenschaften einer Osteosarkomzelllinie, jeweils einen bestimmten osteoblastären Entwicklungs- und Differenzierungsgrad zu repräsentieren, kann aber auch nutzbringend in Untersuchungen angewandt werden, in denen gerade verschiedene osteoblastäre Reifungszustände miteinander verglichen werden sollen. Grundsätzlich sollten aber für in vitro-Versuche als Knochenzellkulturmodell nur solche Zelllinien zur Anwendung kommen, bei denen der Differenzierungsgrad und der osteoblastäre Charakter hinreichend belegt sind (167).

1.5.2 Humane Osteoblastenkulturen

Humane Osteoblastenkulturen stammen vielfach aus isolierter Knochenspongiosa von Spendern, die sich orthopädischen Knochenersatzoperationen unterziehen, z. B. aus trabekulärem Knochen des Caput femoris nach endoprothetischem Gelenkersatz. Die Gewinnung einer Knochenzellkultur aus dem Operationsmaterial wird von verschiedenen Autoren im Prinzip ähnlich beschrieben (75, 150). Nach mechanischer Zerkleinerung und Spülung der Spongiosafragmente erfolgt eine

Kollagenasedissektion der Spongiosaoberfläche und die anschließende Abzentrifugation der Spongiosafragmente mit Aussaat in geeigneten sterilen Schalen. Ebenso werden die nach Kollagenasebehandlung abzentrifugierten Zellen in Kulturflaschen ausgesät. Die derart gewonnenen Monolayerkulturen können weiter subkultiviert und für Stimulationsversuche genutzt werden.

Riggs et al.(1996) haben aus humanem Knochenmark die Präosteoblasten isolieren können, indem die Zellen in Medium, das fetales Kälberserum beinhaltet, kultiviert wurden. Nach ungefähr 14 Tagen und nachdem die Zellen die Konfluenz erreicht hatten (Monolayerkultur) wiesen sie osteoblastäre Eigenschaften auf (147).

Die auf diese Weise gewonnenen Zellen zeigen die charakteristischen Merkmalen des osteoblastären Phänotyps in vitro. Diese sind die Produktion von alkalischer Phosphatase, der Anstieg des intrazellulären cAMP nach Parathormongabe, die Produktion von Osteocalcin nach Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowie die variable Expression von Kollagen Typ I, Osteopontin und anderen Matrixproteinen (56, 91).

Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Präosteoblasten in dieser Phase in Adipozyten differenziert werden können. Dieses passiert z. B. nach Kultivierung mit Dexamethason. Andersherum verlieren die Vorläuferzellen ihren Adipozytencharakter mit zunehmender Konfluenz (14, 82, 113).

2. Fragestellung

Bisphosphonate wurden in den letzten drei Jahrzehnten als potente Inhibitoren der Knochenresorption entwickelt. Sie werden mittlerweile erfolgreich gegen Osteoporose und andere Knochenerkrankungen angesetzt. Dabei wird eine Reduktion der Fraktureninzidenz bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose und eine Linderung der Schmerzsymptomatik bei Patienten mit Knochenmetastasen beobachtet. Ihrer genaueren Wirkungsmechanismus ist in den letzten Jahren intensiv untersucht, aber bleibt weiterhin teils unbekannt. Hauptsächlich intervenieren Bisphosphonate in den interzellulären Metabolismus der reifen Osteoklasten und verursachen deren Apoptose.

Ein direkter Effekt auf die Osteoblasten wird vermutet. Osteoblasten, die mit Bisphosphonaten behandelt wurden, hemmen in Cokulturen mit Osteoklastenvorläuferzellen und reifen Osteoklasten ihre Entwicklung und Aktivität.

Die direkte Wirkung von Bisphosphonaten auf normale humane Osteoblasten ist noch unklar. Es ist ebenso nicht bekannt, ob ihre Wirkung auf Osteosarkomzelllinien mit osteoblastischen Eigenschaften sich von der auf normale humane Osteoblasten unterscheidet.

Diese Arbeit befasst sich mit folgenden Fragenstellungen:

1. Haben Bisphosphonate einen direkten Effekt auf humane Osteoblasten?
Hierfür werden
 - a. die Proliferationsrate und
 - b. der Differenzierungsstatus, beurteilt durch die Expression von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und Prokollagen, untersucht.
2. Beeinflusst die Behandlung mit Bisphosphonaten die parakrine Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten?
Hierfür wurde das Interleukin-6 untersucht. Dieses wird von Osteoblasten produziert und stimuliert die Vorläuferzellen der Osteoklasten zur weiteren Differenzierung sowie die Aktivität der reifen Osteoklasten.
3. Besteht ein unterschiedliches Reaktionsmuster bei der Osteosarkomzelllinie und normalen humanen Osteoblasten sowie auch bei den normalen humanen Osteoblasten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien?
4. Zeigen sich Unterschiede zwischen den Bisphosphonaten drei verschiedener Generationen?

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Zellkulturen

Für die Durchführung der in vitro Untersuchungen wurden die etablierte humane Osteosarkomzellkultur SAOS-2 und eine Zellkultur (ZK 777) humaner Osteoblasten verwendet. Die SAOS-2 Zelllinie wurde von der Zellbank ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen. Die Zellkultur der humanen Osteoblasten wurden im Institut für Pathologie der Justus-Liebig Universität in Gießen angelegt.

3.1.1. SAOS - 2

Diese humane Osteosarkomzelllinie (ATCC HTB 85) stammt vom Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchens (54).

Das Karyogramm zeigt einen hyperdiploiden bis hypopentaploiden Chromosomensatz. Die Zellen besitzen Rezeptoren für hydroxyliertes Vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (44), für Androgene (130) und für Östrogene und Progesteron (172, 175). Sie haben eine hohe basale Produktion von alkalischer Phosphatase (142), reagieren auf Parathormonstimulation mit einem Anstieg des intrazellulären cAMP, synthetisieren Osteonectin (154) und produzieren das so genannte "bone inducing agent" ("BIA") (7).

3.1.2. Humane Osteoblastenkulturen

Die Kultur der humanen Osteoblasten stammt vom Beckenkamm einer 74jährigen Patientin nach elektivem knochenchirurgischen Eingriff wegen Arthrose. Nach der Bearbeitung des Operationsmaterials nach dem entwickelten Mehrschrittverfahren (147, 150) ergeben sich drei Kategorien von Osteoblasten: die Präosteoblasten, die „Collagenase Released“ (aktiven) Osteoblasten und die „Treated Explants“ (Osteozyten).

3.2. Kulturmethoden

3.2.1. Kulturmethoden für die SAOS-2 Zellen

Die SAOS-2 Zellen werden in RPMI 1640 Medium + 10 % FCS (fetales Kälberserum) + 0,01 % Kanamyzin + 2 mM L-Glutamin + 100 U/l Penicillin + 100 U/l Streptomycin (Gibco Laboratories, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland) (154). Das fetale Kälberserum wird inaktiviert, indem es im Wasserbad 30 min auf 57° C erhitzt wird. Die Zellen werden in einem Begasungsschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) unter 37° C, 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

SAOS-2 Zellen werden in kryokonservierter Form bei -196° C in Cryotubes (NUNC GmbH, Wiesbaden, Deutschland) aufbewahrt. Hierfür ist ein kryoprotektives Einfriermedium erforderlich. Dieses besteht aus 8,4 ml RPMI 1640 Medium + 2,4 ml FCS + 1,2 ml DMSO (Dimethylsulfoxid). Zum Auftauen werden die Zellen rasch im Wasserbad bei 37° C erwärmt. Zum Entfernen des DMSO-haltigen Einfriermediums wird die Zellsuspension zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Hierzu werden die Zellen in ein 60 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt, mit 40 ml frischem Kulturmedium (s.o.) versetzt und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und der Vorgang nach Zugabe von 40 ml frischen Kulturmedium wiederholt. Für die Kultur werden die Zellen in 50ml frischen Kulturmediums resuspendiert und in 120 ml fassende Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Ein Mediumwechsel erfolgt in dreitägigem Abstand. Nachdem die Zellen in Kultur das Stadium der Konfluenz erreicht haben, werden sie entweder im Versuch eingesetzt oder zur weiteren Zellvermehrung passagiert. Die Zellpassage ist erforderlich, um eine hohe Zelldichte zu vermeiden, die durch den Aufbrauch des Kulturmediums und der Anhäufung der sauren Metaboliten sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken würde.

Zum Passagieren der Zellen wird das serumhaltige Medium verworfen und die Zellen mit 50 ml einer Pufferlösung (Hank's balanced salt solution, Biochrom, Berlin Deutschland) gespült. Zur Ablösung und Separation der Zellen werden 10 ml einer Trypsin / EDTA Lösung (Biochrom, Berlin Deutschland) zugegeben. Nach einer ca. 15-minütigen Inkubation wird die Zellablösung mikroskopisch kontrolliert. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in die Kulturflaschen, bzw. Lochplatten verteilt.

Alle Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Reinraumwerkbank (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

3.2.2 Kulturmethoden für die humanen Osteoblasten

3.2.2.1 Gewinnung der Knochenfragmente

Die Entnahme des Knochenmaterials erfolgt steril im Operationsaal während eines elektiven knochenchirurgischen Eingriffes. Je nach Möglichkeit wird es entweder sofort verarbeitet, oder bis maximal 24 Stunden in Ham's F 12 K Medium + 10 % FCS bei 4 ° C aufbewahrt.

Vor der eigentlichen Isolierung der verschiedenen Knochenzellen werden die operativ gewonnenen Knochenstücke zunächst mechanisch aufbereitet. Hierzu wird der Knochen in einem mit Ham's F 12 K Medium oder Hank's Puffer gefüllten Behälter überführt. Die Spongiosa wird mittels eines scharfen Löffels von der Kompakta und dem Bindegewebe befreit. Sie wird dann in eine Zellkulturschale, ebenfalls mit Ham's F 12 K Medium oder Hank's Puffer gefüllt und bis auf eine Fragmentgröße 1x1x1mm mittels einer Schere zerkleinert. Die Isolierung der Zellen erfolgt in einem eigenen hierfür in Anlehnung an Robey und Termine entwickelten Mehrschrittverfahren (150, 13, 83).

3.2.2.2 Gewinn der Knochenmarkstammzellen (Präosteoblasten)

Die Knochenfragmente werden mehrmals mit Ham's F 12 K Medium gespült und die Spülflüssigkeit in ein 60 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Nach dem Abzentrifugieren (10 min bei 1500 U/min) wird der Überstand, der Erythrozyten und Adipozyten enthält dekantiert und das Pellet mit Ham's F 12 K Medium + 10 % FCS + 100 U/l Penicillin + 100 U/l Streptomycin resuspendiert. Anschließend wird es in eine 120 ml Kulturflasche überführt. Die Zellsuspension wird unter 37° C, 95 % Luft und 5 % CO₂ im Begasungsschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Alle 5 Tage erfolgt ein Mediumwechsel. Die Kontrolle, ob die Zellen bereits adhären erfolgt im Phasenkontrastmikroskop.

3.2.2.3 Gewinn der „Collagenase Released“ (aktiven) Osteoblasten

Die vorbereiteten Knochenstücke werden in einen sterilisierten, mit 40 ml Ham's F 12 K Medium und einem Magnetrührstäbchen gefüllten 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Dazu werden sterilfiltriert über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) 25 mg (250 U/ml) Kollagenase Typ IV (Sigma Diagnostics, Montana, USA) in 10 ml Medium gegeben. Der Kolben wird verschlossen und bei einer Temperatur von 37 ° C 2,5 Stunden lang mit 500-700 U/min gerührt. Anschließend wird der Überstand vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dieselbe Prozedur zur Kultivierung der Zellen wie in 3.2.2.2. wiederholt.

3.2.2.4 Aussaat der Knochenfragmente - „Treated Explants“ (Osteozyten)

Die mittlerweile von der Kollagenaselösung freien Knochenfragmente werden mit Medium gespült und in eine Petrischale mit Ham's F 12 K Medium + 10 % FCS + 100 U/l Penicillin + 100 U/l Streptomycin ausgesät und im Brutschrank gehalten. Das Medium wird jede 5 Tage abgesaugt und durch frisches ersetzt. Die elektronenmikroskopische Kontrolle zeigt eine erste Emigration der Zellen nach 14 -21 Tagen.

3.2.2.5 Kultivierung und Passagierung

Der Mediumwechsel wird wie oben beschrieben wiederholt bis die Zellen in den Flaschen bzw. Petrischalen das Stadium der Konfluenz erreicht haben. Dann werden sie abtrypsiniert und in neue Flaschen passagiert.

3.3. Messverfahren

3.3.1 Zellproliferation

3.3.1.1. Elektronische Partikelzählung

Die Messung der Zellen vor der Verteilung in die Lochplatten erfolgte mit einem Coulter Counter Feinpartikelzähler (Coulter Electronics Ltd., Luton, UK). Hierbei werden die Anzahl und die Größenverteilung der Einzelpartikel, welche in einer elektrisch leitenden, isotonen Lösung suspendiert sind, bestimmt. Die Messapparatur

besteht aus einer Messkammer, in der zwei Elektroden (Kathode - Anode) in die Probenlösung eintauchen. Ein bestimmter Flüssigkeitsstrom der Probenlösung (100µm) wird durch die Kathodenapertur angesaugt. Bei der Partikelpassage wird der Stromfluss zwischen den Elektroden beeinflusst. Jedes durchtretende Partikel verursacht eine Widerstandsänderung, deren Höhe proportional zur Partikelgröße ist. So kann anhand der aufgenommenen Signale über die Zählzeit auf Größe (Impulshöhe) und Anzahl (Impulsanzahl) der Partikel (Zellen) geschlossen werden (59).

Die zu zählenden Zellkulturen werden abtrypsinisiert, die Zellen in der Trypsinlösung zentrifugiert und in einem definierten Mediumvolumen (20ml) resuspendiert. Auf die gleichmässige Zellseparation ist zu achten, deswegen sollte die Zellsuspension mit Pipetten mehrmals aufgesaugt und ausgespült werden. Eine geringe Menge (0,250ml) der Zellsuspension wird abpipetiert und in ein Probenröhrchen mit Isoton II-Elektrolytlösung versetzt. Nach fünfmaliger Auszählung von 100µl Probenvolumen wird die Anzahl der Zellen pro ml Probenvolumen und die Gesamtzahl der Zellen in der Mediumsuspension berechnet.

3.3.1.2. MTT – Assay

Dieser fotometrische Ansatz ist ein schnelles und quantitatives Verfahren zur Bestimmung der Anzahl und Aktivität verschiedener Zellen. Die Tertazoliumsalze messen die Aktivität verschiedener Dehydrogenasen. Das Verfahren basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumrings durch die Enzyme der Mitochondrien, also kann die Reaktion nur in lebenden Zellen stattfinden (125).

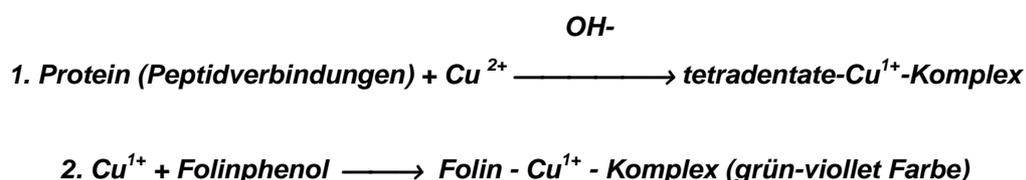
Das [3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyl]- tetrazoliumbromid (Thiazolblau, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wird im Medium aufgelöst: 100ml MTT-Lösung bestehen aus 60 ml Medium + 15 ml FCS + 25 ml 0,9% NaCl mit 125 mg Thiazolblau. Nachdem das Behandlungsmedium aus den 96-Lochplatten mit den Kontrollen und den behandelten Zellen zu Zwecken der weiteren Parameterbestimmung entfernt wird, werden 200µl von der MTT-Lösung (gelblich) pro well zugegeben. Die Platten werden im Brutschrank bei 37°C 4 Stunden lang inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Tetrazoliumsalz von den Dehydrogenasen zu Formazankristalle (dunkel blau) reduziert. Nach den 4 Stunden wird die MTT-Lösung entfernt und 100 µl/well Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen, Germany) zur Auflösung der Formazankristalle zugegeben und die

Platten werden gerüttelt (132). Die optische Dichte der entstehenden blau-violetten Lösung wird innerhalb von 5-10 Minuten im Elisa Reader (LAB-Systems, Hagedorn, Deutschland) bei 520 nm mit einer Referenzlänge von 690 nm gemessen. Die optische Dichte ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen und vor allem zu ihrer Aktivität, die der Anzahl der Mitochondrien entspricht.

3.3.2. Gesamtprotein

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Zellen mit 150 µl einer 0,1% Tritonlösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) lysiert. Die Lyse der Zellen wird durch optische Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop sichergestellt. Aus dem Lysat werden 100 µl mit 50 µl einer Lösung aus 8 x 25% Natriumbicarbonat, 1 x 1% Natriumkaliumtartrat, 1 x 2% Kupfersulfat und 10 x 1N NaOH versetzt und 10 Minuten inkubiert. Danach werden 100 µl einer 1:10 verdünnten Folinlösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt und für weitere 20 Minuten inkubiert. Der durch Triton entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und 150 µl des Überstands bei 690 nm im Elisa Reader gemessen.

Das Prinzip des Messverfahrens ist die Reduktion von Kupfer und die Farbreaktion nach der Verbindung der Kupfermoleküle mit Folinphenol.



Parallel wird eine Eichkurve mit ansteigenden Referenzkonzentrationen angefertigt, nach der die entsprechende Proteinkonzentration der Probe berechnet wird (109).

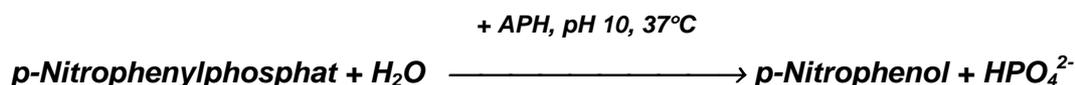
Die mit den wie folgend beschriebenen Verfahren gemessenen Produkte der Zellen werden auf das Gesamtprotein vom entsprechenden Loch (well) bezogen und als spezifische dargestellt.

3.3.3. Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase im menschlichen Serum setzt sich aus mehreren Isoenzymen zusammen, die vom Gallengangsepithel, von den Knochen, Nieren, Leukozyten, Plazenta, Darm sowie primären oder metastatischen Knochentumoren

produziert werden. Die knochenspezifische alkalische Phosphatase wird von den Osteoblasten produziert und befindet sich hauptsächlich verankert in ihrer Zellmembran (30, 72).

Das Prinzip des Messverfahrens der alkalischen Phosphatase ist die Farbreaktion durch die enzymatische Spaltung des Substrats p-Nitrophenylphosphat (pNPP) ins gelbe p-Nitrophenol (56).



Die Substratzusammensetzung wird in der folgenden Tabelle beschrieben

100 ml Substrat	
26,6 ml	100mM pNPP
13,3 ml	1 N Karbonatpuffer, pH 10
13,3 ml	MgCl ₂
46,8 ml	Aqua Dest

Zu den restlichen 50 µl (siehe 3.3.2.) vom Zellysat in jedem Loch der 96-Lochplatten werden 150 µl vom pNPP-Substrat hinzugegeben. Es erfolgt eine erste Messung der Extinktion des entstandenen, gelb gefärbten Reaktionproduktes p-Nitrophenol bei 410 nm mit einer Referenzlänge 490 nm im Elisa Reader. Eine zweite Messung erfolgt in 20-180 Minuten abhängig von der Geschwindigkeit der Reaktion, die analog zur Enzymaktivität ist. Die produzierte Menge der alkalischen Phosphatase pro well wird durch die folgende Formel berechnet:

$$\text{Alkalische Phosphatase (U/l)} = \Delta \text{optische Dichte} \times 410 / \text{Optische Dichte des Standarts} \times 1 / \Delta t (\text{min})$$

wobei als Standart 50 µl 410µM Paranitrophenol gelöst in Aqua Dest benutzt werden. Anschließend wird die alkalische Phosphatase auf das Gesamtprotein vom entsprechenden Loch bezogen und als spezifische Aktivität dargestellt.

3.3.4 Osteocalcin

Osteocalcin ist ein kleines Protein, welches von reifen Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophische Chondrozyten produziert wird.

Zur Bestimmung der Osteocalcinproduktion der behandelten und unbehandelten Zellen wurde nach der definierten Einwirkzeit der Medikamente der Überstand abpipetiert und bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Die Bestimmung erfolgte mit dem kommerziellen NovoCalcin-ELISA-Assay (Metra Biosystems, Inc., California, USA). Das in $25\mu\text{l}$ des Überstands erhaltene Osteocalcin wird zunächst an dem Maus-Anti-Osteocalcin monoklonalen Antikörper gebunden, anschließend wird dieses mit einem lyophilisierten Ziegen-anti-Maus-IgG Antikörper verbunden. Der letzte ist mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Nach Inkubation mit dem Substrat (p-Nitrophenyl Phosphat) wird innerhalb von 15 Minuten die optische Dichte in 405 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standards wurde per Computerprogramm eine Eichkurve erstellt, die zur Berechnung der Probenkonzentrationen herangezogen wurde.

3.3.5 C-terminales Propeptid des Procollagens Typ I

Kollagen (hauptsächlich Kollagen Typ I) ist zu 90% Bestandteil des Osteoids. Es wird im Osteoblast als pre-pro- α -Ketten synthetisiert.

Zur Bestimmung der Kollagenproduktion bei den behandelten und unbehandelten Zellen wurden nach der definierten Einwirkzeit der Medikamenten der Überstand abpipetiert und bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Die Bestimmung erfolgte mit dem kommerziellen Prolagen-C-ELISA-Assay der (Metra Biosystems, Inc., California, USA). Es ist ein "sandwich"-Immunoassay. Das in $100\mu\text{l}$ des Überstands erhaltene c-terminale-Propeptid des Kollagens Typ I wird zunächst an den Kaninchen-Anti-CICP polyklonalen Antikörper gebunden, anschließend wird dieses mit einem Ziegen-anti-Kaninchen-Konjugat mit alkalischer Phosphatase verbunden. Nach Inkubation mit dem Substrat (p-Nitrophenyl Phosphat) wird innerhalb von 15 Minuten die optische Dichte in 405 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standards wird per Computerprogramm eine Eichkurve erstellt, die zur Berechnung der Probenkonzentrationen herangezogen wird.

3.3.6. Interleukin-6

Zur Bestimmung der Il-6 Produktion bei den behandelten und unbehandelten Zellkulturen wurden nach der definierten Einwirkzeit der Medikamente der Überstand abpipetiert und bei -70°C bis zur Messung eingefroren. Die Bestimmung erfolgte mit dem kommerziellen IL-6 Endpoint Enzyme Immunometric Assay (DPC Biermann

GmbH, Bad-Nauheim, Deutschland). 100µl des Überstands werden in die „wells“ der Mikroplate, die mit dem monoklonalen Antikörper spezifisch gegen humanes IL-6 beschichtet sind, pipetiert und für 2 Stunden inkubiert. Nach einem Waschvorgang wird ein polyklonaler Antikörper gegen IL-6, affinitäts-gereinigt, mit Meerrettich-peroxidase-konjugiert, dazugegeben. Nach weiterer zweistündiger Inkubation und erneutem Waschvorgang ist der „sandwich“ Komplex entstanden. Das chromogene Substrat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) reagiert und verbindet sich mit dem enzymatisch markierten zweiten IL-6 Antikörper. Die entstehende Farbdichte gemessen bei 450 nm (Elisa Reader, LAB-Systems, Hagedorn, Deutschland) ist direkt proportional zu der IL-6 Konzentration. Anhand der mitgeführten Standards wird per Computerprogramm eine Eichkurve erstellt, die zur Berechnung der Probenkonzentrationen herangezogen wird.

3.4 Versuche

Die Stimulation der Zellen mit Bisphosphonaten erfolgte nach einem mehrstufigen Schema. Zuerst wurden von allen Zellen die entsprechende Zellzahl auf Kunststoff-96-Lochplatten eingesät, so dass sich während des Versuches die Zellen in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden. Nach Erreichen der Präkonfluenz (24h bei den Osteosarkomzellen und 48 h bei den humanen Osteoblasten) wurde das Kulturmedium durch das serumfreie Stimulationsmedium ersetzt. Jeder Versuch wurde mit jeweils 6 Parallelansätze pro Gruppe durchgeführt. Die Einwirkzeit des Stimulationsmediums betrug 48 Stunden.

3.4.1 Herstellung der Stimulationsmedien

3.4.1.1 Serumfreies Medium

Für die SAOS-2 Zellen wurde das Medium RPMI und für die humanen Osteoblasten Ham's F 12 K benutzt. Zum optimalen Wachstum der Zellen in der Kultur ist das fetale Kälberserum notwendig. FKS dient zur Anreicherung des künstlichen Mediums mit Serumproteinen, beinhaltet aber auch Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Dieses behindert die standardisierten Versuchsbedingungen, weil auf der einen Seite das Wachstum der Zellen in der Kultur parallel durch die Stimulationsfaktoren unkontrolliert beeinflusst wird und auf der anderen Seite die APH, OC, CACP, IL-6 im FKS bei der Messung der

Zellenprodukte unter Stimulation mitgemessen werden würden. Deswegen wird das bovine Serumalbumin (BSA), welches stets in genau definierter Zusammensetzung und Qualität erhältlich ist und den Grundbedarf der Zellen an Protein decken kann, benutzt. Die kristalline Festsubstanz (Merck, Wien, Österreich) wird aufgelöst, steril filtriert und in einem Verhältnis 0,1 % zum Medium dazugegeben.

3.4.1.2 Bisphosphonate

Von allen Bisphosphonaten wurde eine 10^{-2} M in 0,9 % NaCl Stammlösung angefertigt:

0,0249 g Etidronat in 10 ml 0,9 % NaCl

0,0325 g Alendronat in 10 ml 0,9 % NaCl

0,0359 g Ibandronat in 10 ml 0,9 % NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Diese Stammlösungen wurden sterilfiltriert und mit serumfreiem Medium weiterverdünnt. Folgende Stimulationsmedien wurden benutzt:

Medium für unbehandelte Kontrollen: 0,1 % BSA

Medium für Etidronatbehandlung: 0,1 % BSA + 10^{-3} M bis 10^{-11} M

Medium für Alendronatbehandlung: 0,1 % BSA + 10^{-3} M bis 10^{-13} M

Medium für Ibandronatbehandlung: 0,1 % BSA + 10^{-3} M bis 10^{-18} M

3.4.2 Passage der Zelllinien auf 96-Lochplatten

Die Zellen jeder zu testenden Zelllinie wurden von den Kulturflaschen abtrypsiniert und im Coulter Counter gezählt. Anschließend wurden sie im geeigneten Kulturmedium + 10 % FKS in die Platten ausgesät. Die SAOS-2 Zellen wurden mit 6000 Zellen pro well ausgesät. Die größeren humanen Osteoblasten wurden mit 3000-4000 Zellen pro well ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde täglich mit dem Doppelkontrastphase-Lichtmikroskop kontrolliert. Insgesamt waren für jede Zelllinie acht 96-Lochplatten benötigt. Auf jeder Platte waren sechs wells als ungehandelte Kontrolle und sechs Wells pro jede Stimulationskonzentration beschriftet. Für jedes Medikament wurden zwei identische Platten (für Ibandronat, wegen der hohen Anzahl der Stimulationsverdünnungen vier) vorbereitet. Von jedem Plattenpaar wurde die eine Platte für den MTT-Assay und die zweite für die Bestimmung von APH, OC, CACP, IL-6 und Gesamtprotein benutzt.

3.4.3 Inkubation der Zelllinien mit den Stimulationsmedien

Nachdem die Zellen auf dem Boden des „wells“ adhären waren und das Stadium der Subkonfluenz erreicht hatten, erfolgte der Mediumwechsel auf das jeweilige serumfreie Stimulationsmedium. Dies erfolgte nach 24 h bei den Saos-2 Zellen und nach 48 h bei den humanen Osteoblasten. Die serumhaltigen Mediumüberstände wurden verworfen und nach Spülung mit Hank's Pufferlösung mit den Stimulationsmedien (250 ml/well) in den verschiedenen Konzentrationen versetzt. Die Einwirkdauer betrug für alle Zellen 48 Stunden.

3.4.4 Asservierung der Inkubationsmedien

Nach Ablauf der Einwirkdauer wurden die 96-Lochplatten aus dem Brutschrank genommen und wie folgt weiterverarbeitet:

Von der einen Platte von jedem Plattenpaar wurden die Überstände in eine entsprechend beschriftete 96-Lochplatte abpipetiert und die Zellen sofort für den MTT Assay angesetzt.

Von der zweiten Platte von jedem Plattenpaar wurden die Überstände ebenso in eine entsprechend beschriftete 96-Lochplatte abpipetiert und die auf dem Boden jedes wells adhären Zellen mit 0,1 % Tritonlösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) beschickt und sofort bei -70°C eingefroren. Die Zellysate wurden später für APH und Gesamtprotein angesetzt.

Die 96-Lochplatten mit den Überständen wurden auch sofort bei - 70°C eingefroren und später für OC, CACP und IL-6 angesetzt.

3.5 Auswertung und Statistik

Statistische Unterschiede wurden zwischen der Kontrollgruppe und jeder bisphosphonatbehandelten Gruppe, zwischen den drei Bisphosphonaten auf dieselbe Zelllinie und zwischen den Bisphosphonateffekten auf die verschiedenen Zelllinien untereinander untersucht. Zur Berechnung der Signifikanz wurde eine Varianzanalyse (ANOVA), sowie ein Duenett Student Test für unabhängige Stichproben angewandt.

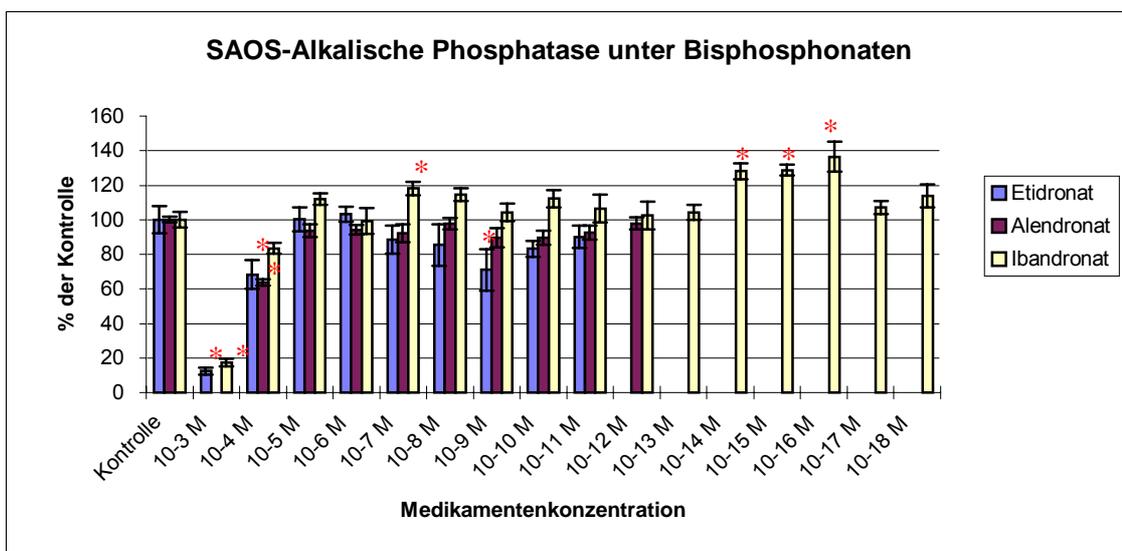
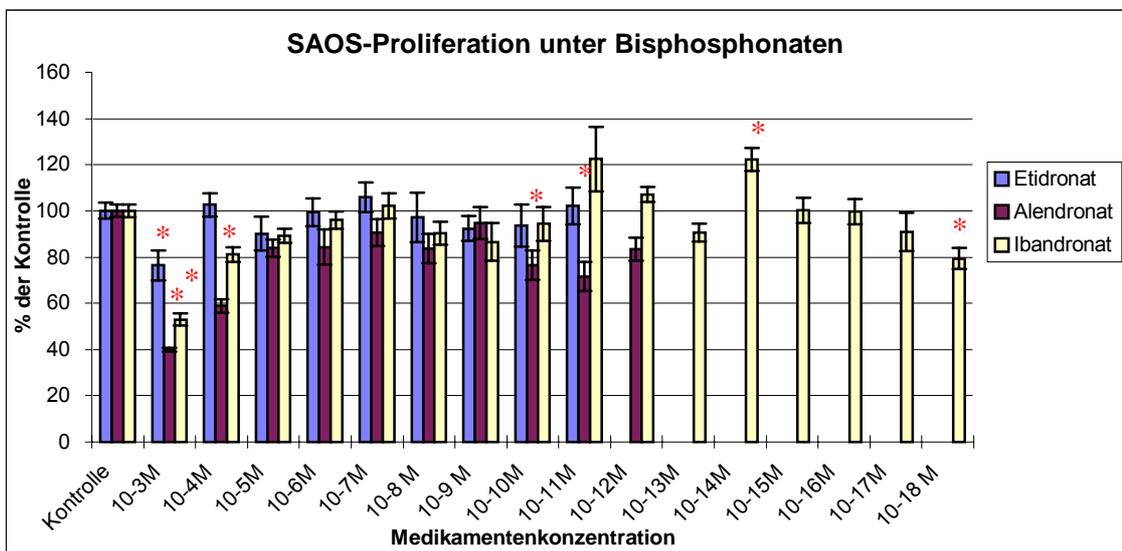
Für den statistischen Vergleich der Bisphosphonateffekte auf die verschiedenen Zelllinien wurden zusätzlich der Scheffé-test and der Tukey-test benutzt. Alle Versuche wurden dreimal weiderholt.

Die Ergebnisse werden als % der Kontrolle \pm SEM präsentiert. Ein $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant bezeichnet.

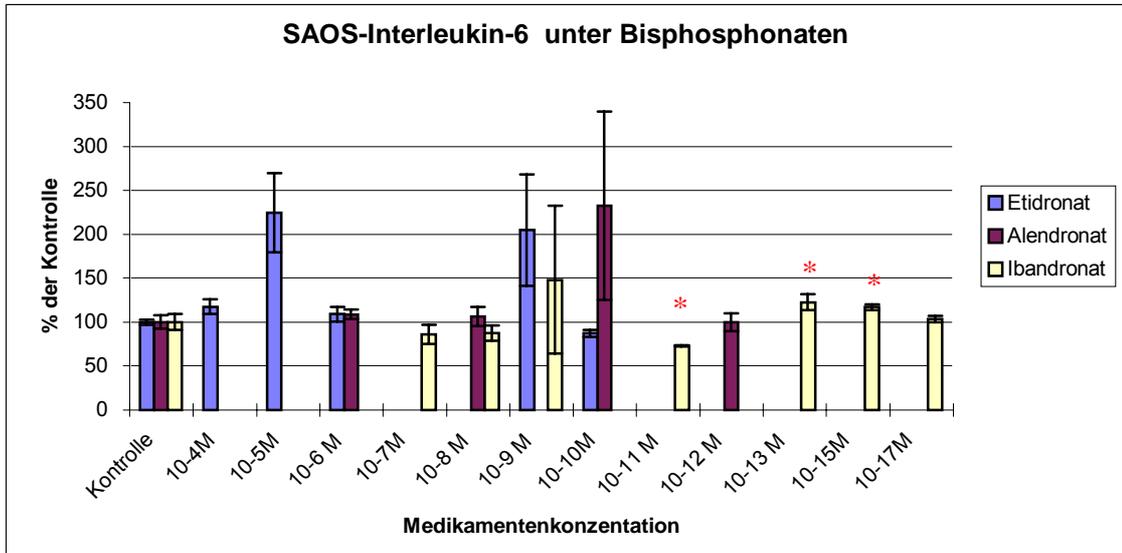
4. Ergebnisse

Im folgende werden die Ergebnisse der Stimulationsversuche in Abfolge der einzelnen getesteten Zelllinien graphisch dargestellt. Jede Graphik fast alle drei Bisphosphonate zusammen. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der Kontrolle berechnet. Die Produktion der alkalischen Phosphatase, Interleukin-6 und c-terminales Propeptid des Kollagens Typ I wurde pro mg Protein ausgerechnet, um zellzahlkorrigierte Ergebnisse (spezifische Aktivität) zu erhalten.

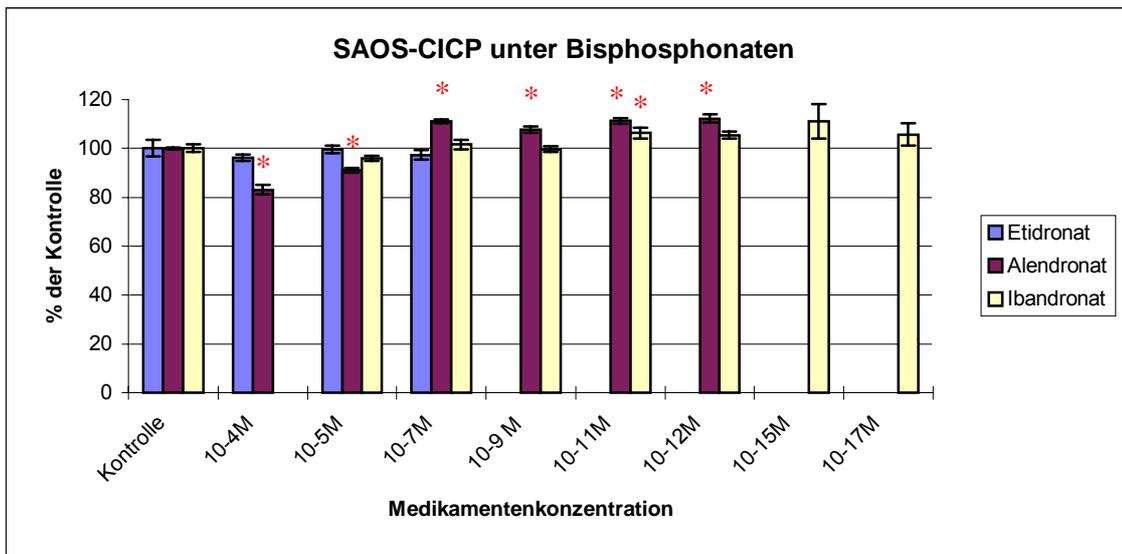
4.1 Einfluss der Bisphosphonate auf die Osteosarkomzelllinie SAOS



Grafik 1 und 2: Zellproliferation und alkalische Phosphataseproduktion der Osteosarkomzelllinie SAOS unter dem Einfluß von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 3: Interleukin-6 Expression von den SAOS-Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 4: Produktion des c terminalen Propeptides des Prokollagens TypI von den SAOS-Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)

Die Behandlung der SAOS mit den höchsten Konzentrationen aller Bisphosphonate (10-3 und 10-4 M) ist toxisch für die Zellen. Es wurden lichtmikroskopisch deutliche morphologische Veränderungen beobachtet (abgerundete, nicht adhärente Zellen), die für nicht vitale Zellen sprechen, welches durch die Trypanblaufärbung bestätigt wurde.

Ein signifikant positiver Einfluss auf die Proliferationsrate der SAOS-Zellen ergibt sich bei der Behandlung mit Ibandronat in der Konzentration 10^{-14} M. Dagegen Alendronat in niedrigeren Konzentration (10^{-10} M und 10^{-11} M) und Ibandronat in 10^{-15} und 10^{-18} M haben einen signifikant hemmenden Effekt auf die Proliferation.

Die Produktion von alkalischer Phosphatase nimmt im Vergleich zur Kontrolle signifikant unter der Behandlung mit 10^{-9} M Etidronat ab. Eine signifikante Zunahme wird unter 10^{-7} M sowie 10^{-14} M bis 10^{-16} M Ibandronat beobachtet. Die Behandlung der SAOS mit niedrigeren Konzentrationen von Alendronat verursacht tendenziell eine Zunahme der alkalischen Phosphatase, die aber keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle zeigt.

Unter Behandlung mit 10^{-11} M Ibandronat wird eine signifikante Reduktion der Il-6-Produktion dagegen wird bei noch niedrigeren Konzentrationen (10^{-13} M und 10^{-15} M) ein signifikanter Anstieg der Il-6-Expression beobachtet.

Die Produktion des Prokollagens Typ I wird statistisch signifikant positiv von 10^{-11} M Ibandronat und von 10^{-7} M bis 10^{-12} M Alendronat beeinflusst. 10^{-4} M und 10^{-5} M Alendronat wirken parallel zur Hemmung der Proliferation, signifikant negativ auf die Kollagenproduktion.

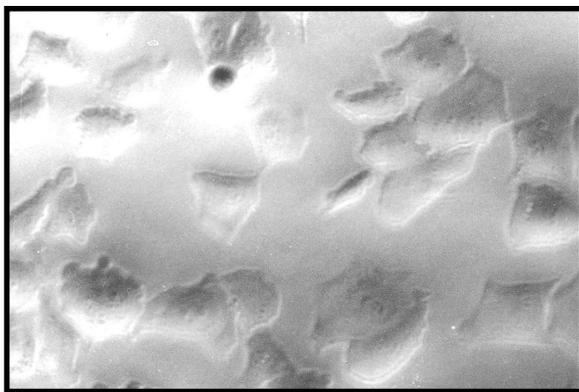


Abb. 1

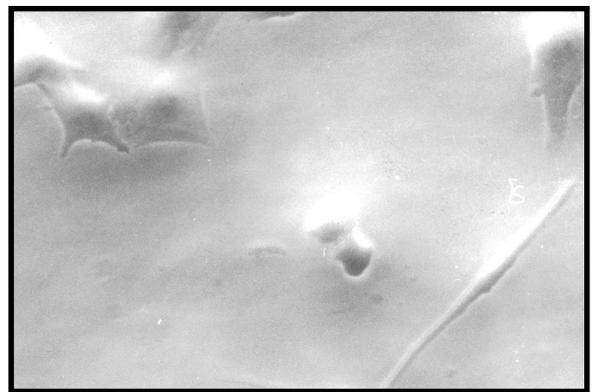


Abb. 2

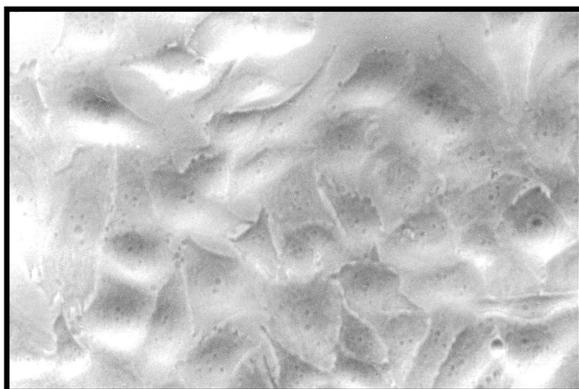
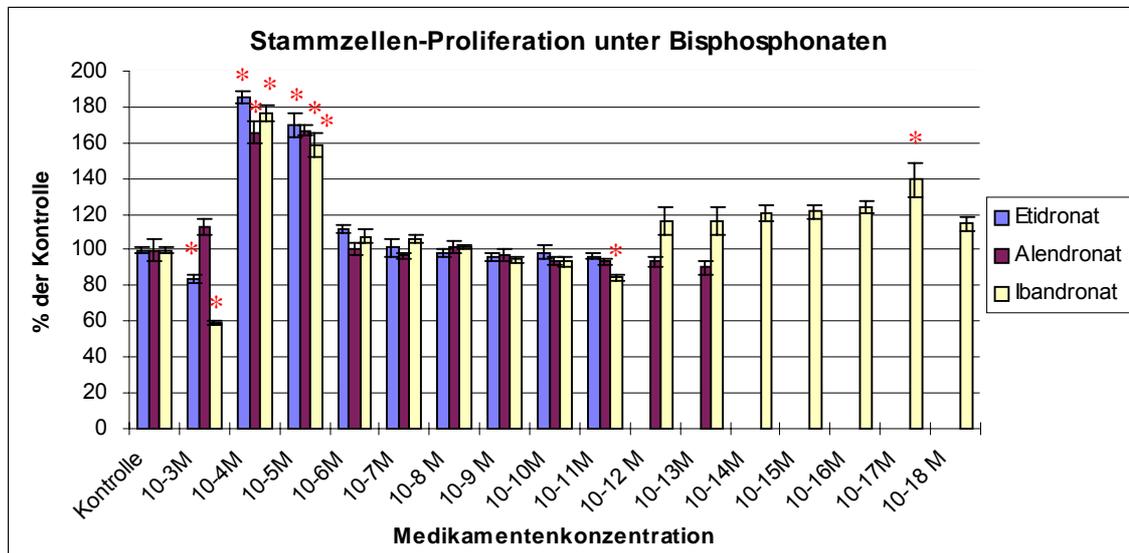


Abb. 3

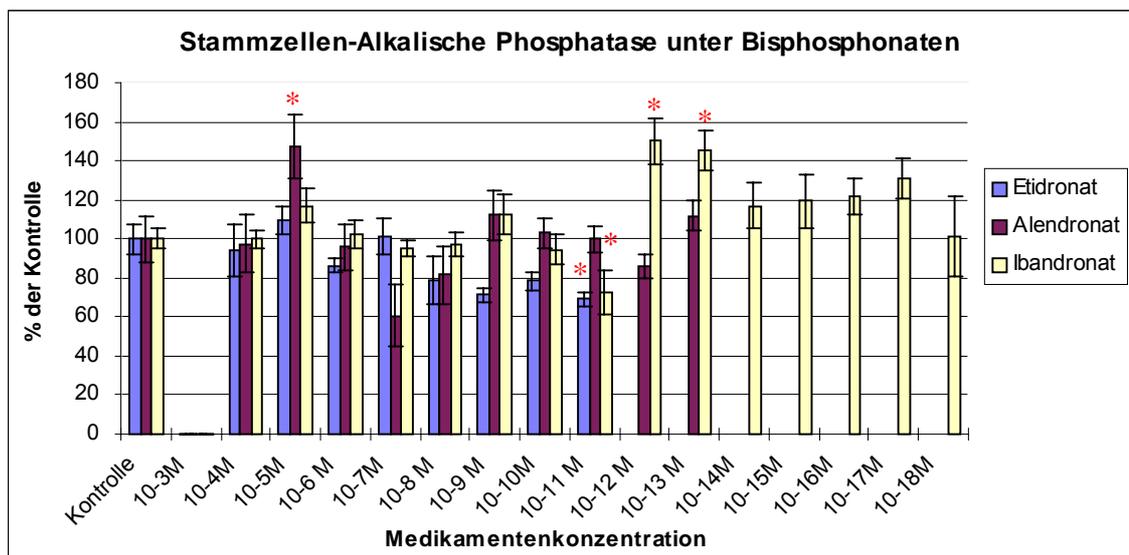
Abb.1-3:
Osteosarkomzellen, SAOS unter Bisphosphonaten
1. Kontrolle
2. Toxische Einwirkung von 10^{-3} M Etidronat
3. Stimulation unter 10^{-7} M Ibandronat

4.2. Einfluss der Bisphosphonate auf die normalen humanen Osteoblasten

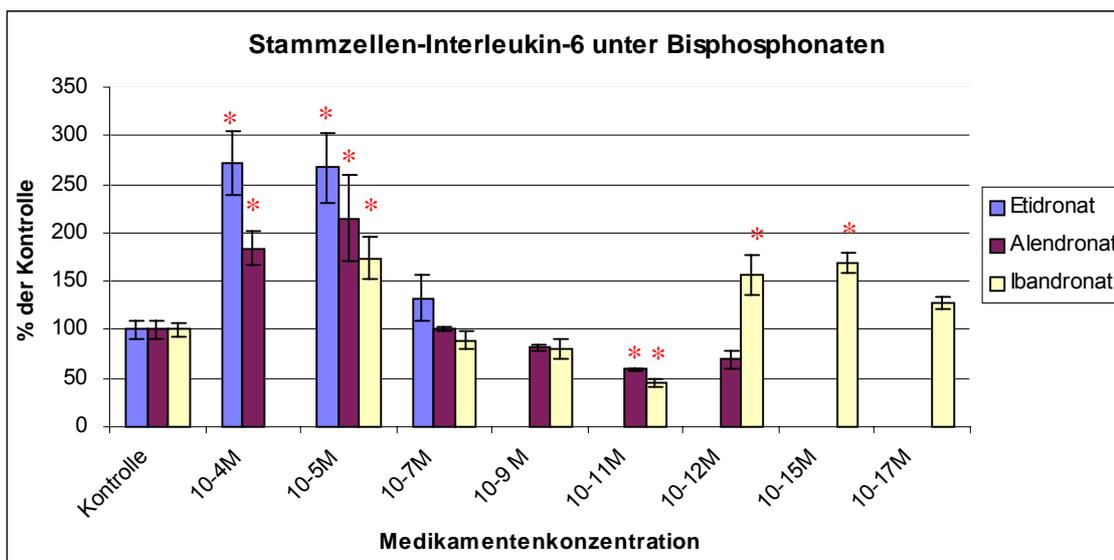
4.2.1 Stammzellen



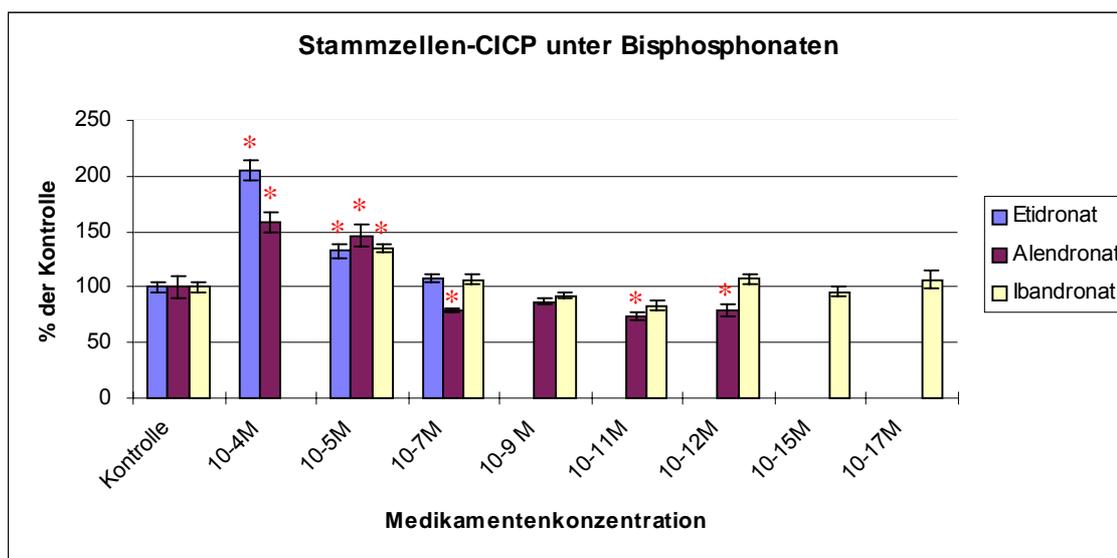
Grafik 5: Proliferationsrate der Stammzellen der normalen humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 6: Alkalische Phosphataseproduktion von den Stammzellen der normalen humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 7: Interleukin-6 Expression von den Stammzellen der humanen normalen Osteoblasten unter dem Einfluß von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 8: Produktion des c terminalen Propeptides des Prokollagens Typ I von den Stammzellen der humanen normalen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)

Alle Bisphosphonate in den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M haben einen signifikanten positiven Einfluss auf die Proliferationsrate der Stammzellen, die IL-6- und die Prokollagenproduktion. Signifikant negativ auf die Proliferation wirkt Ibandronat bei 10^{-12} M, wobei in der Konzentration 10^{-17} M bewirkt es eine weitere Zunahme der Proliferationsrate.

Nach Behandlung mit 10^{-11} M Etidronat und 10^{-11} M Ibandronat ergibt sich eine signifikante Abnahme der Expression von alkalischer Phosphatase, während 10^{-12} M und 10^{-13} M Ibandronat eine erhöhte, im Vergleich zur Kontrolle, Expression von alkalischer Phosphatase hervorrufen. 10^{-11} M und 10^{-12} M Alendronat bewirken tendenziell eine Abnahme der alkalischen Phosphatase, die aber statisch nicht signifikant ist.

Die Il-6-Produktion ist signifikant negativ unter der Behandlung mit 10^{-11} M Alendronat und Ibandronat beeinflusst. 10^{-12} M und 10^{-15} M Ibandronat verursachen dagegen einen Anstieg der Il-6-Produktion.

Die Stammzellen reduzieren signifikant ihre Prokollagenproduktion unter Behandlung mit 10^{-7} M, 10^{-11} M und 10^{-12} M Alendronat im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Wobei dieselben Ibandronatkonzentrationen (10^{-9} M und 10^{-11} M) auch eine negative Tendenz bzgl. der Kollagenproduktion aufweisen, die aber statistisch nicht signifikant ist.

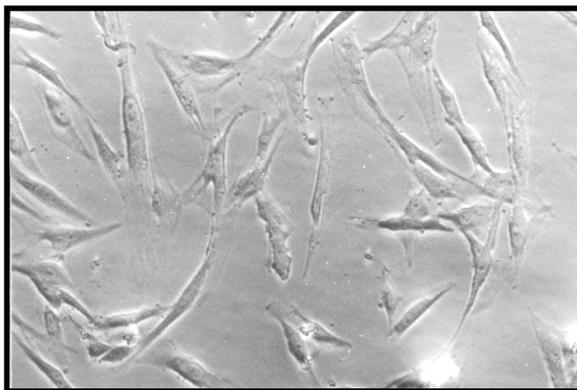


Abb. 4



Abb. 5

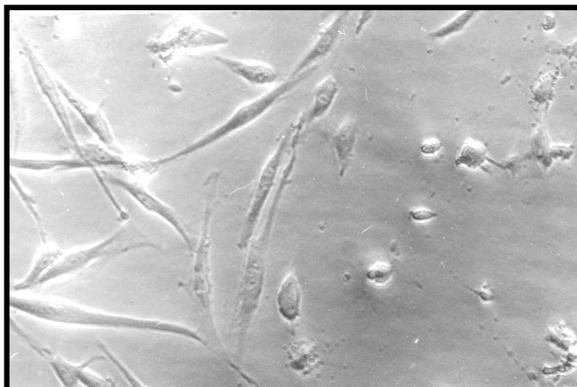
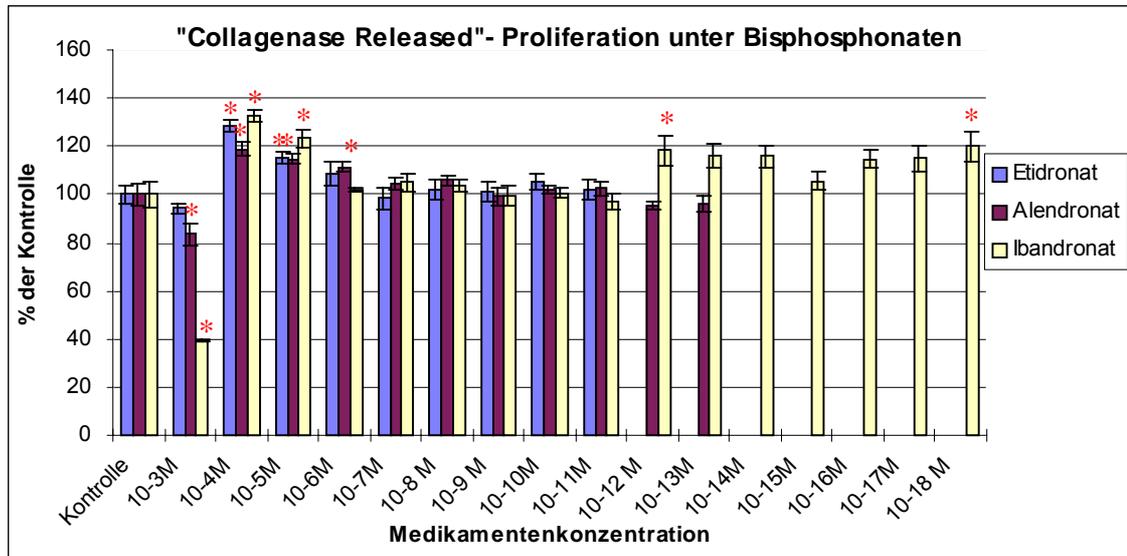


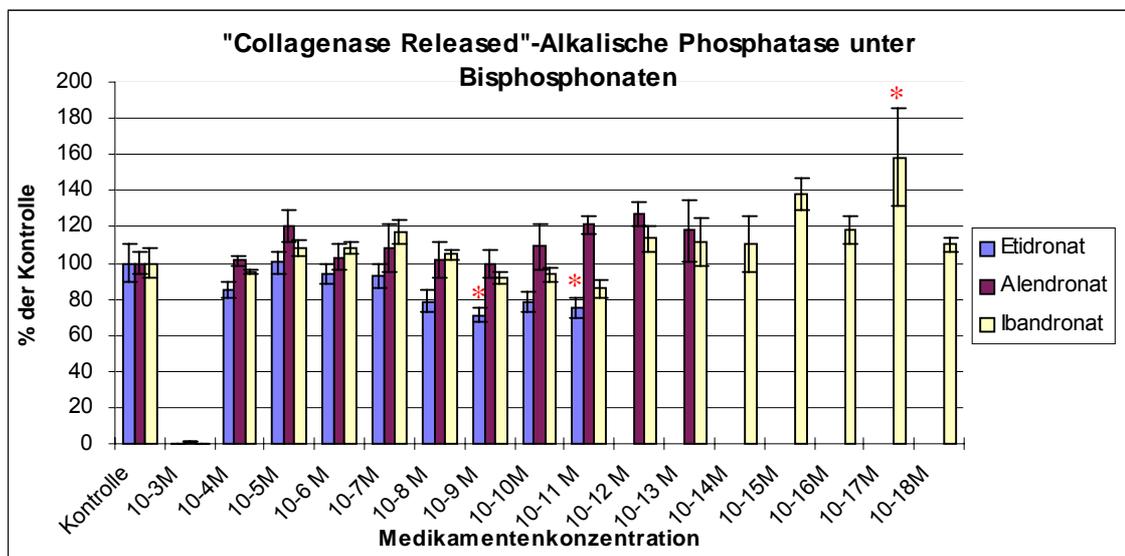
Abb. 6

Abb.4-6: Stammzellen unter Bisphosphonaten
4. Kontrolle
5. Toxische Einwirkung von 10^{-3} M Ibandronat
6. Suppression unter 10^{-11} M Ibandronat

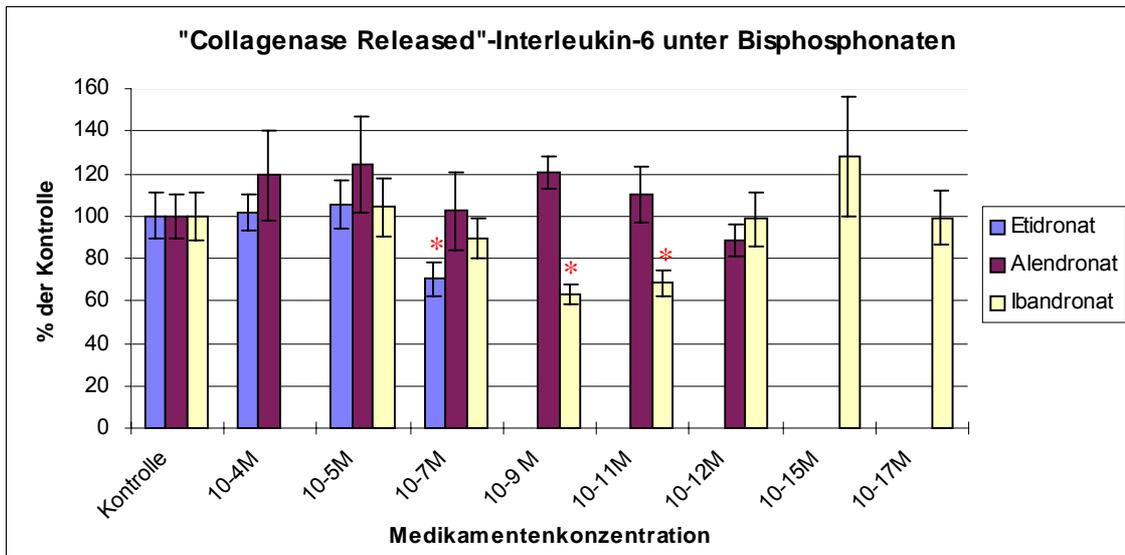
4.2.2. „Collagenase released“ Zellen



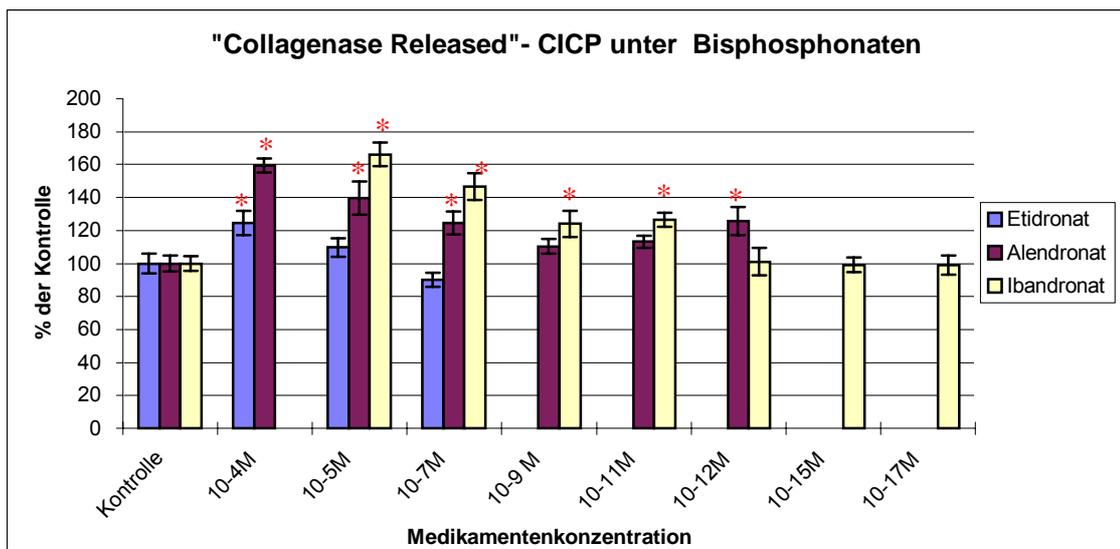
Grafik 9: Proliferationsrate der „collagenase treated“ normalen humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* $p < 0,05$)



Grafik 10: Alkalische Phosphatase-Produktion von den „Collagenase released“ Zellen der normalen humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* $p < 0,05$)



Grafik 11: Interleukin-6-Expression den „collagenase released“ Zellen der normalen humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 12: Produktion des c terminalen Propeptides des Prokollagens TypI von den „Collagenase released“ Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)

Auch auf die „collagenase released“ Zellen ist die Wirkung von 10^{-3} M aller Bisphosphonate toxisch bzw. stark hemmend, sowohl was Proliferationsrate als auch was die Expression der alkalischen Phosphatase angeht.

Nach der 48-stündigen Behandlung bewirken alle Bisphosphonate in den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M einen signifikant stimulierenden Effekt auf die Proliferation. 10^{-6} M Alendronat weisen weiterhin eine proliferative Wirkung auf.

Ibandronat bewirkt einen signifikanten Anstieg der Proliferation in den Konzentrationen 10^{-12} M und 10^{-18} M.

Auf die Expression der alkalischen Phosphatase wirken 10^{-9} und 10^{-11} M Etidronat signifikant hemmend. Dagegen wirken 10^{-17} M Ibandronat signifikant stimulierend, wobei ab 10^{-12} M eine stimulierende Tendenz beobachtet wird.

Unter Behandlung mit allen Bisphosphonaten weisen die „collagenase released“ Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine verminderte Il-6-Produktion im Zellüberstand auf. 10^{-7} M Etidronat sowie 10^{-9} M und 10^{-11} M Ibandronat hemmen signifikant die Il-6-Produktion. 10^{-12} M Alendronat reduzieren zwar die Interleukin-6 Produktion um 88% der Kontrollgruppe, dies ist aber statisch nicht signifikant.

Zuletzt bewirkt die Behandlung mit allen Bisphosphonaten einen stimulierenden Effekt auf die Produktion von Prokollagen Typ I in folgenden Konzentrationen: 10^{-4} M Etidronat, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-12} M Alendronat sowie 10^{-5} M bis 10^{-9} M Ibandronat.

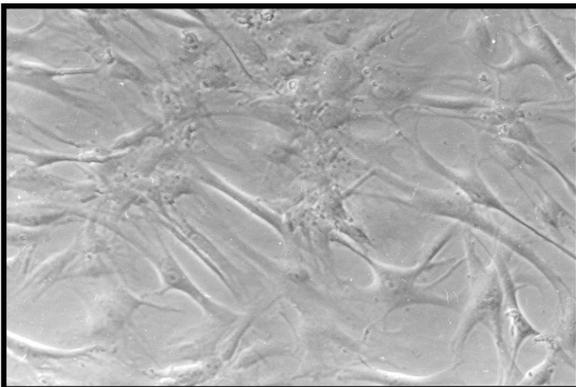


Abb. 7



Abb. 8

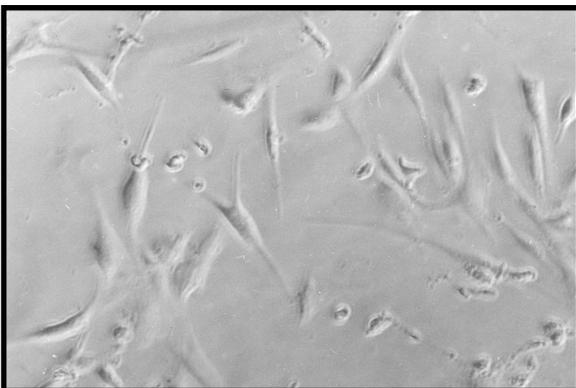


Abb. 9

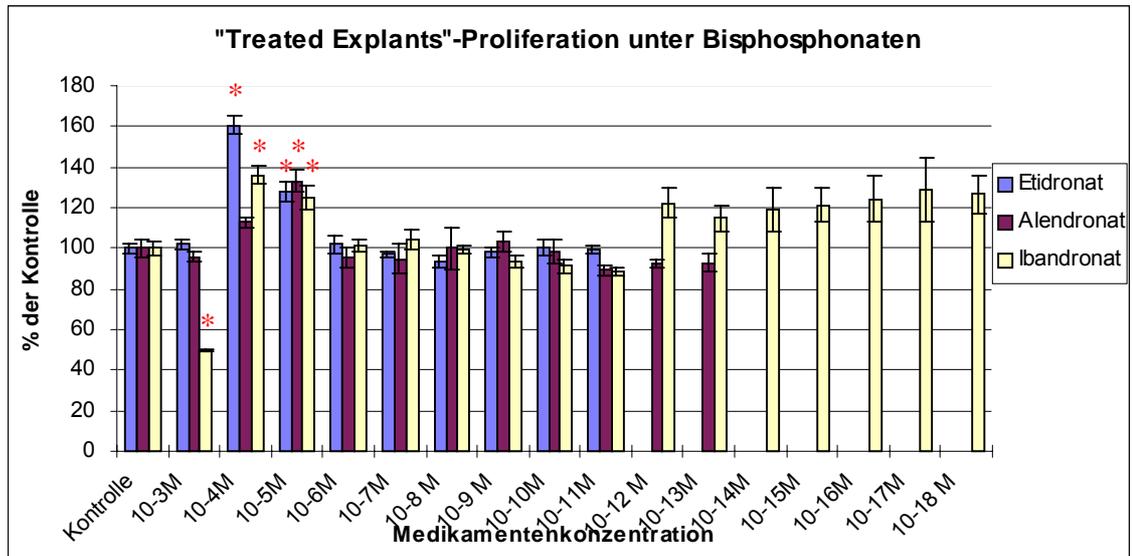
Abb.7-9: „Collagenase released“ Osteoblasten unter Bisphosphonaten

7. Kontrolle

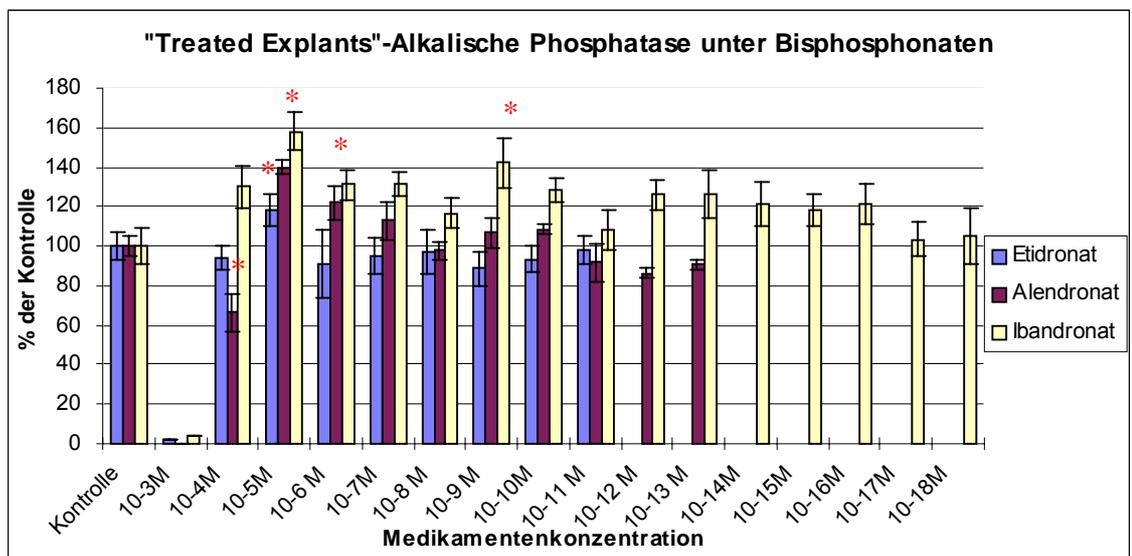
8. Toxische Einwirkung von 10^{-3} M Alendronat

9. Suppression unter 10^{-8} M Alendronat

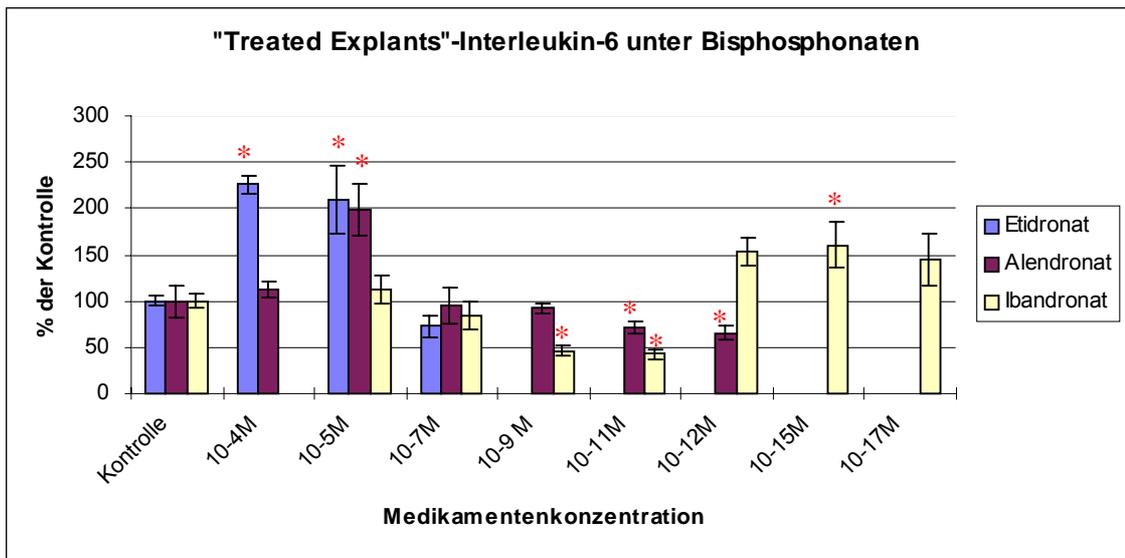
4.2.3 „Treated Explants“



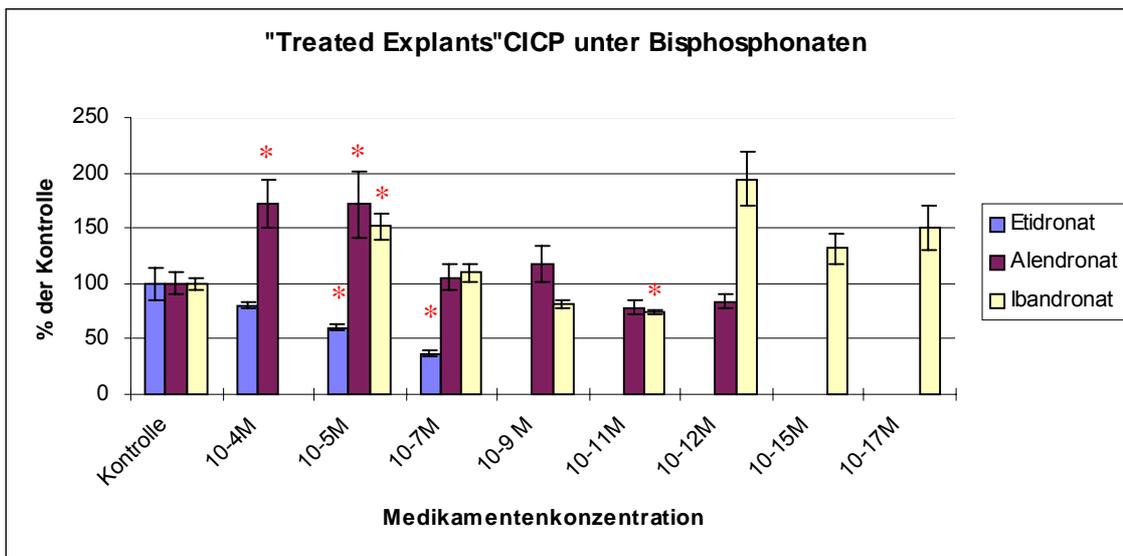
Grafik 13: Proliferationsrate der „treated explants“ unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* $p < 0,05$)



Grafik 14: Alkalische Phosphatase-Produktion von den „Treated Explants“ Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* $p < 0,05$)



Grafik 15: Interleukin-6-Expression von den „Treated explants“ Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)



Grafik 16: Produktion des c terminalen Propeptides des Prokollagens Typ I von den „treated explants“ Zellen unter dem Einfluss von Etidronat, Alendronat und Ibandronat. (* p<0,05)

Alle Bisphosphonate in 10⁻³ M wirken toxisch bzw. hemmend auf die Proliferation der „treated explants“ sowie auf ihre Expression von alkalischer Phosphatase.

Die Behandlung über 48 Stunden mit 10⁻⁴ M Etidronat und mit 10⁻⁴ M Ibandronat sowie mit 10⁻⁵ M aller Bisphosphonate hat einen signifikanten Stimulationseffekt auf die Proliferationsrate. Unter 10⁻¹² bis 10⁻¹⁸ M Ibandronat zeigt die Proliferation der Zellen eine ansteigende Tendenz, signifikant aber nur unter 10⁻¹² und 10⁻¹⁸ M.

Der toxische Effekte aller Bisphosphonate in der Konzentration 10^{-3} M bewirkt konsekutiv eine geringe Expression von alkalischer Phosphatase. Alendronat hat auch in 10^{-4} M einen signifikant hemmenden Effekt. Dagegen 10^{-5} M Alendronat, 10^{-5} M, 10^{-7} M und 10^{-9} M Ibandronat wirken signifikant stimulierend auf die Expression der alkalischen Phosphatase.

Die Il-6-Produktion wird unter Behandlung mit den höheren Konzentrationen von Etidronat (10^{-4} und 10^{-5} M) und Alendronat (10^{-5} M) signifikant positiv beeinflusst. Im Gegenteil hemmen niedrigere Konzentrationen von Alendronat (10^{-11} M und 10^{-12} M) und Ibandronat (10^{-9} M und 10^{-11} M) signifikant die Il-6-Produktion. Ibandronat weist erneut unter noch niedrigeren Konzentrationen (10^{-15} M) einen zweiten signifikant stimulierenden Effekt auf.

Die Prokollagen-Typ I-Produktion der „treated explants“ wird unter 10^{-5} M und 10^{-7} M Etidronat signifikant gesenkt. Höhere Konzentrationen (10^{-4} M und 10^{-5} M) von Alendronat stimulieren die Prokollagen-Typ I-Produktion. 10^{-5} M Ibandronat verursachen nach 48-stündiger Behandlung eine signifikant höhere Prokollagenproduktion. Dagegen führen 10^{-11} M Ibandronat zu einer signifikanten Suppression der Prokollagenproduktion.

Alle Überstände wurden auf die Osteocalcinproduktion untersucht. Hierbei lag die unstimulierte Basisproduktion unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA-Assay. Unter Bisphosphonatenstimulation konnte eine höhere Osteocalcinproduktion, analog zum Anstieg der alkalischen Phosphatase, gemessen werden. Somit besteht ein angedeuteter Dosis-Wirkung-Effekt.



Abb. 10

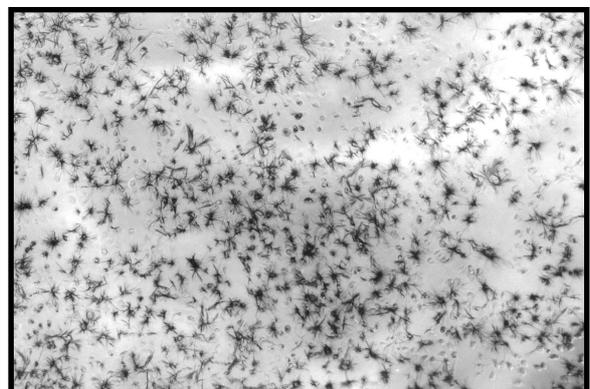


Abb. 11

Abb.10-11: „Treated Explants“ Osteoblasten unter Bisphosphonaten

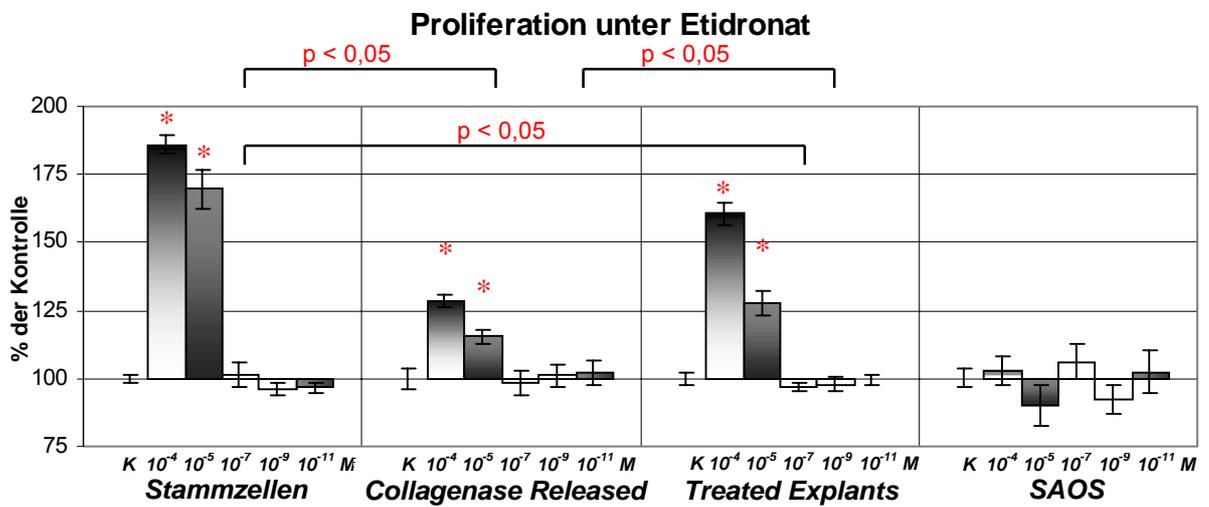
10. Kontrolle, MTT Assay

11. Stimulation unter 10^{-5} M Alendronat, MTT-Assay

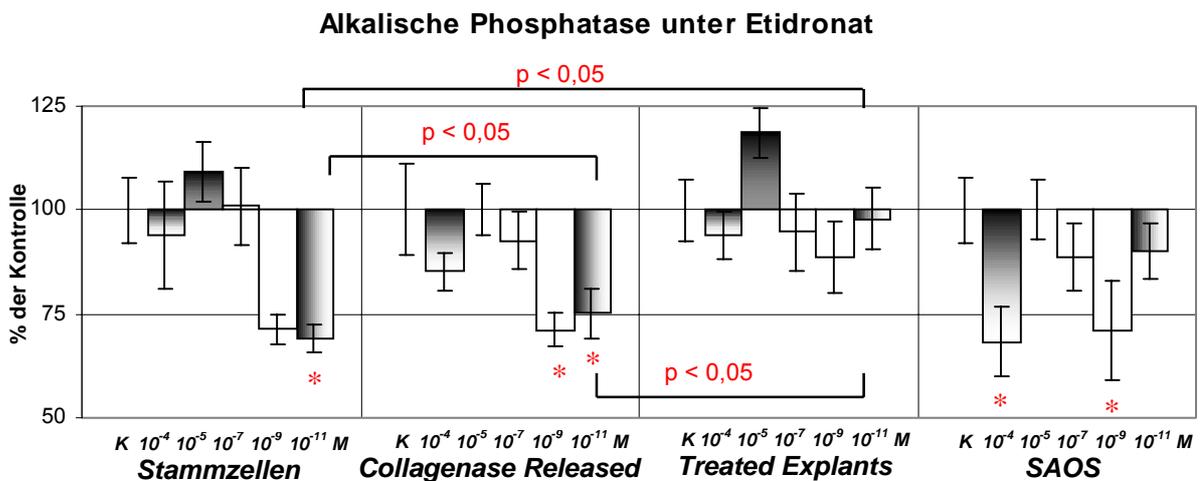
4.2 Vergleich der verwendeten Bisphosphonate

Nachfolgend ein graphischer Vergleich des Einflusses der verschiedenen Bisphosphonate auf Proliferation und Differenzierung der normalen humanen Osteoblasten und der Osteosarkomzelllinie mit osteoblastischen Eigenschaften SAOS. Die Sterne stellen die signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Bisphosphonatkonzentrationen und die Klammern zwischen der Zelllinien dar.

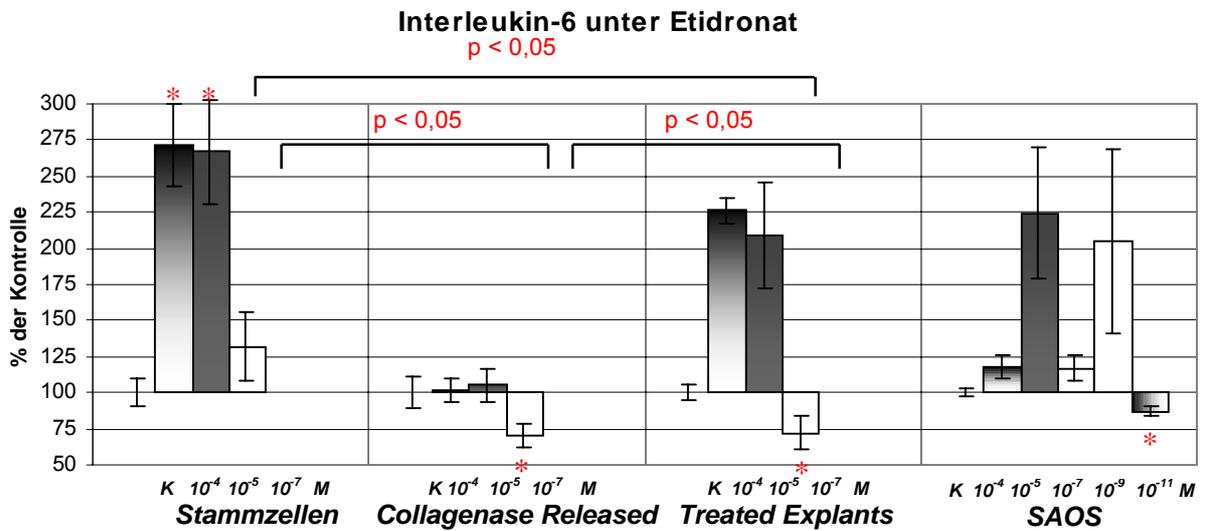
4.2.1 Etidronat



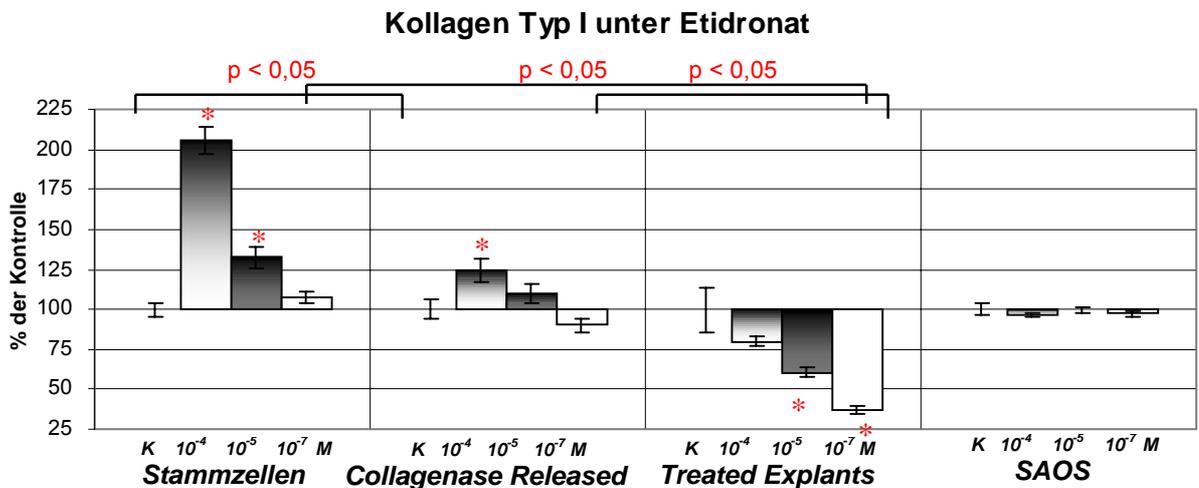
Grafik 17: Einfluss von Etidronat auf die Proliferationsrate der humanen Osteoblasten, * = $p < 0,05$



Grafik 18: Einfluss von Etidronat auf die Expression der alkalischen Phosphatase von den humanen Osteoblasten. * = $p < 0,05$



Grafik 19: Einfluss von Etidronat auf die Interleukin-6-Expression der humanen Osteoblasten. * = p < 0,05



Grafik 20: Einfluss von Etidronat auf die Prokollagenproduktion der humanen Osteoblasten. * = p < 0,05

Etidronat wirkt in der Konzentration 10^{-3} M toxisch auf alle Zellen. In der Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M wirkt es proliferierend auf die normalen humanen Osteoblasten aller Reifungsstadien und signifikant stärker auf die Stammzellen.

Die Expression der alkalischen Phosphatase wird von Etidronat negativ bei den SAOS, den osteoblastären Stammzellen und den „collagenase treated“ beeinflusst.

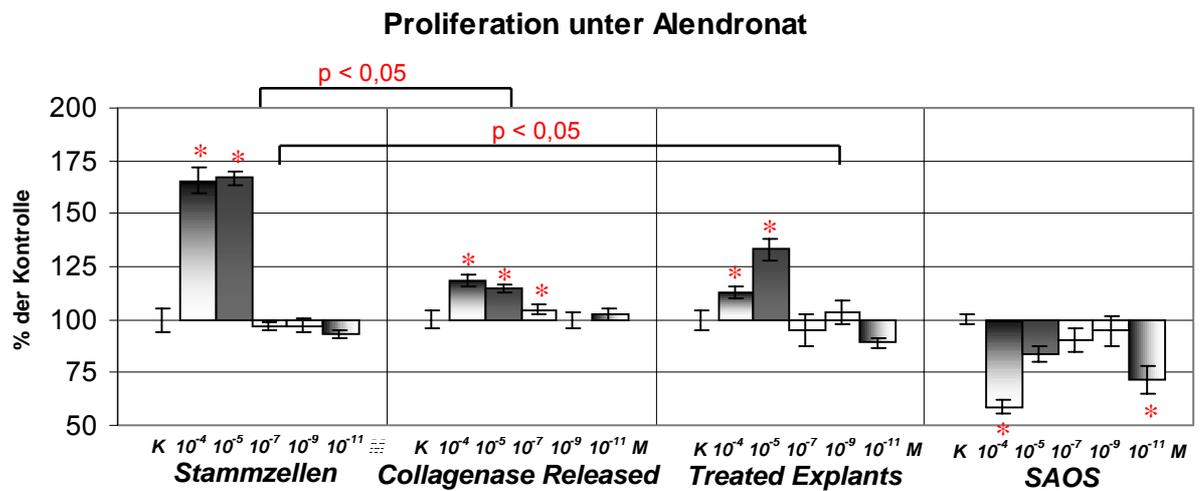
Bei den „treated explants“ weist Etidronat keine Einwirkung auf die Expression der alkalischen Phosphatase auf.

Der Einfluss von Etidronat ist unterschiedlich auf die Expression des Il-6 in den untersuchten Zelllinien. Eine abnehmende Tendenz wurde bei den niedrigen Etidronatkonzentrationen festgestellt, die statistisch signifikant nur bei den SAOS-Zellen (10^{-10} M) und den „collagenase released“ Zellen (10^{-7} M) war. In den höheren Konzentrationen (10^{-4} M und 10^{-5} M) bewirkte Etidronat eine erhöhte Il-6-Produktion von den SAOS-Zellen, den Stammzellen und den Treated Explants. Die selben Etidronatkonzentrationen hatten keinen Einfluss auf die „collagenase released“ Zellen.

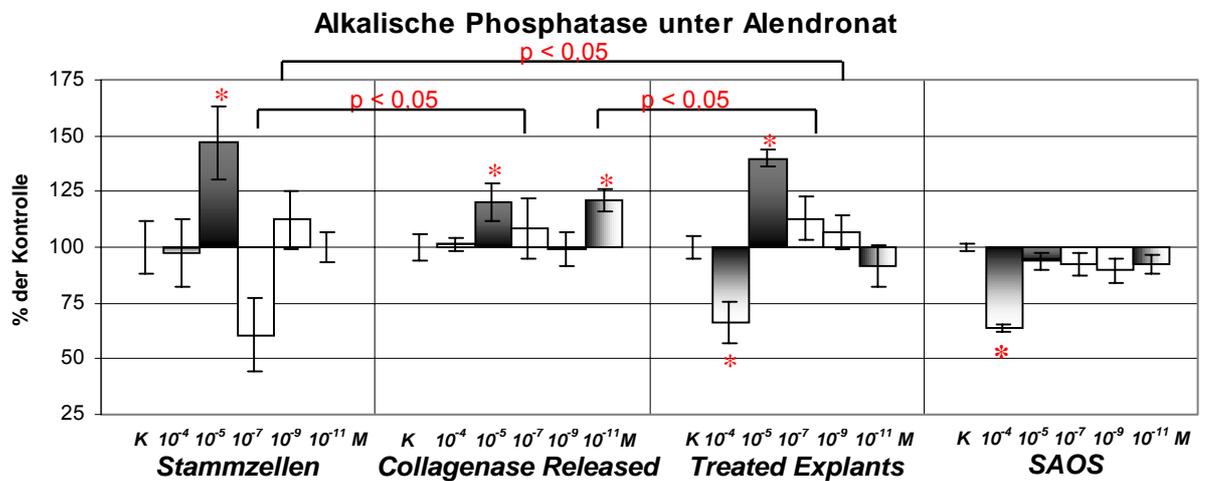
Was die Kollagen Typ I-Produktion betrifft, konnte eine statistisch signifikante Stimulation bei den Stammzellen (10^{-4} M und 10^{-5} M) und „collagenase released“ Zellen (10^{-4} M) festgestellt werden. Bei den „treated explants“ wurde unter Etidronatbehandlung eine signifikant starke Suppression der Kollagenproduktion bis zu 37% der unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Kollagenproduktion bei den SAOS wurde nicht beeinflusst.

Nach Etidronatbehandlung bietet das Verhalten der Osteoblasten in den drei Reifungsstadien unter sich sowie im Vergleich zu den SAOS signifikante Unterschiede bezüglich Proliferation und Differenzierung.

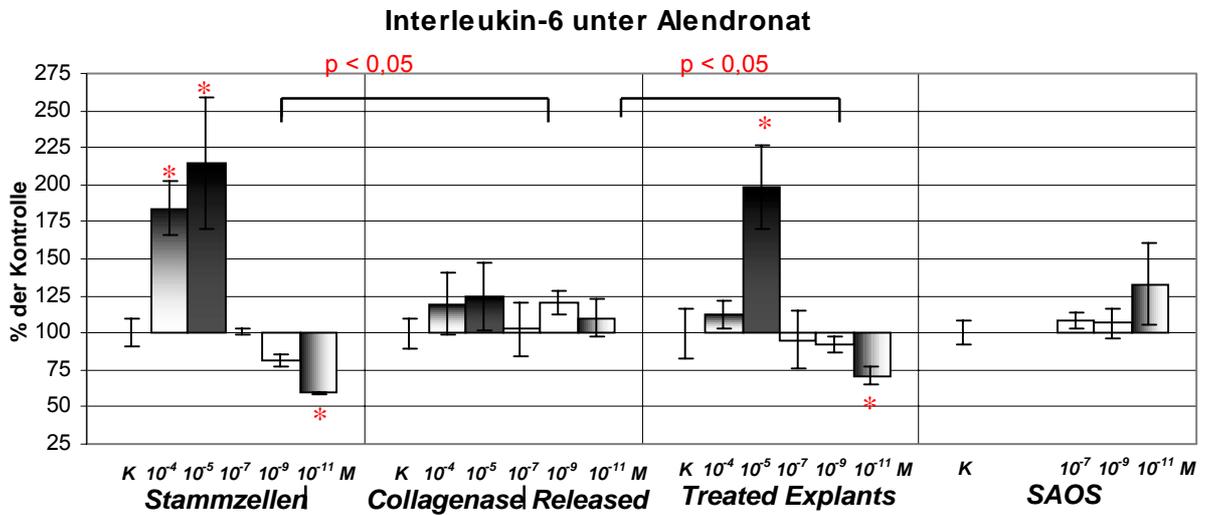
4.2.2 Alendronat



Grafik 21: Einfluss von Alendronat auf die Proliferationsrate der humanen Osteoblasten. * = $p < 0,05$

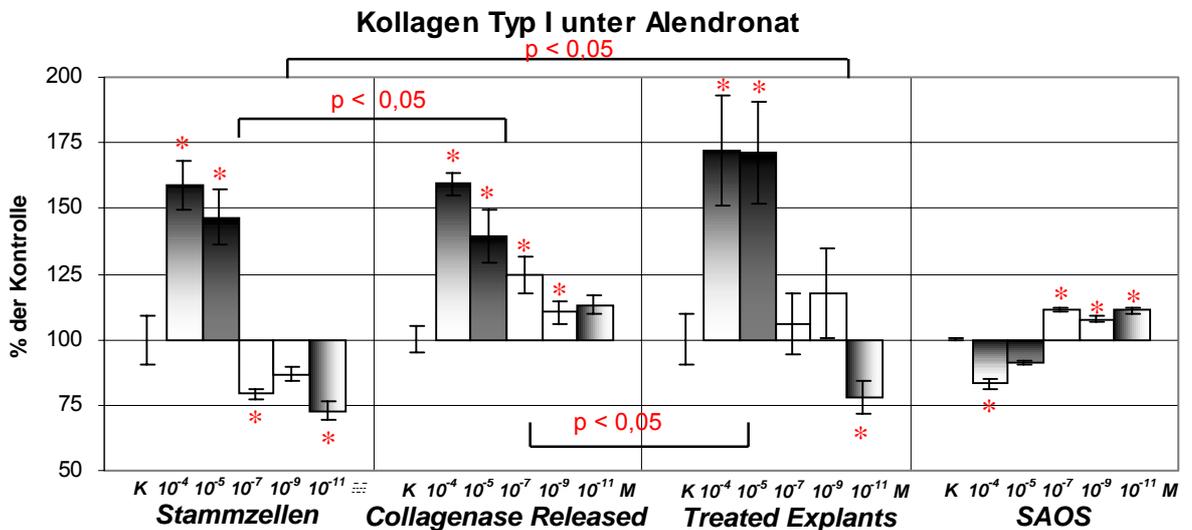


Grafik 22: Einfluss von Alendronat auf die Expression alkalischen Phosphatase von den humanen Osteoblasten. * = $p < 0,05$



Grafik 23: Einfluss von Alendronat auf die Interleukin-6-Expression der humanen Osteoblasten.

* = $p < 0,05$



Grafik 24: Einfluss von Alendronat auf die Prokollagenproduktion von den humanen Osteoblasten

* = $p < 0,05$

Alendronat wirkt in der Konzentration 10^{-3} M toxisch auf alle Zellen. In den Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M wirkt es proliferierend auf die normalen humanen Osteoblasten aller Reifungsstadien und signifikant stärker auf die Stammzellen. Dagegen wirken 10^{-4} M Alendronat statistisch signifikant hemmend auf die SAOS-Zellen.

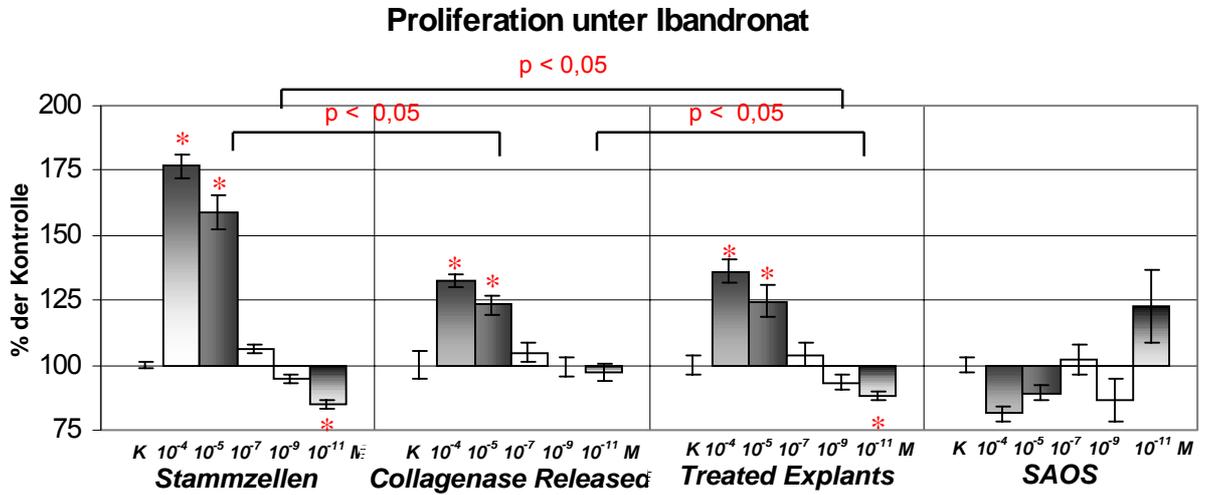
Die Expression der alkalischen Phosphatase wird von Alendronat tendenziell negativ bei den SAOS beeinflusst. Bei den osteoblastären Stammzellen und den „treated explants“ stimulieren 10^{-5} M Alendronat signifikant die Produktion von alkalischer Phosphatase. In niedrigeren Konzentrationen (10^{-11} M bis 10^{-13} M) entsteht bei SAOS, Stammzellen und „treated explants“ eine abnehmende Tendenz in der Produktion von alkalischer Phosphatase, wobei unter den selben Konzentrationen weisen die „collagen released“ Zellen eine zunehmende Tendenz in der Expression von alkalischer Phosphatase, allerdings ohne statistische Relevanz aufzuweisen.

Was die Produktion von Il-6 angeht, wurde unter Behandlung mit 10^{-4} M und 10^{-5} M Alendronat ein stimulierender Effekt auf die Stammzellen, die „collagenase released“ sowie auf die „treated explants“ beobachtet, der signifikant stärker auf die ersten war. Auf die SAOS und die „collagenase released“ Zellen konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden. 10^{-11} M Alendronat hemmen dagegen signifikant die Il-6-Produktion bei den Stammzellen, während die selbe Konzentration bei den „treated explants“ eine statistisch nicht signifikante Reduktion aufweist.

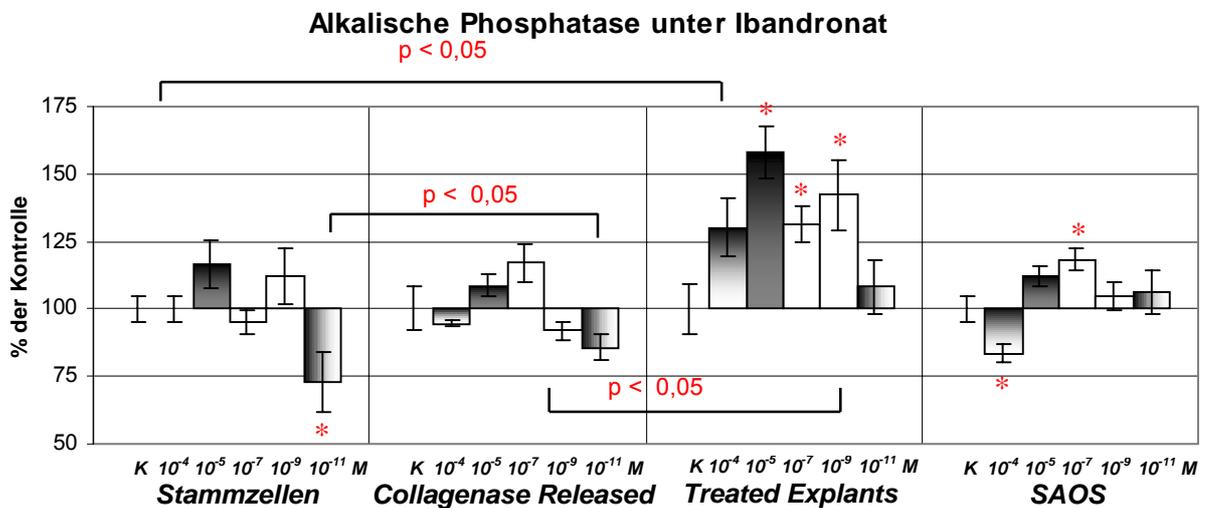
Die Kollagen Typ I-Produktion wurde bei allen Zellen unter Alendronatbehandlung stimuliert: bei den Stammzellen und den „treated explants“ unter Behandlung mit 10^{-4} M und 10^{-5} M; bei den „collagenase released“ unter Behandlung mit 10^{-4} M bis 10^{-7} M und 10^{-12} M und bei den SAOS unter Behandlung mit 10^{-7} M bis 10^{-12} M. Hier muss erwähnt werden, dass Stammzellen und „treated explants“ unter Behandlung mit Alendronat in niedrigeren Konzentrationen (10^{-11} M und 10^{-12} M) eine tendenziell abnehmende Kollagenproduktion aufweisen, die statistisch nicht signifikant ist.

Nach Alendronatbehandlung bietet das Verhalten der Osteoblasten in den drei Reifungsstadien unter sich sowie im Vergleich zu den SAOS signifikante Unterschiede bezüglich Proliferation und Differenzierung

4.2.3 Ibandronat

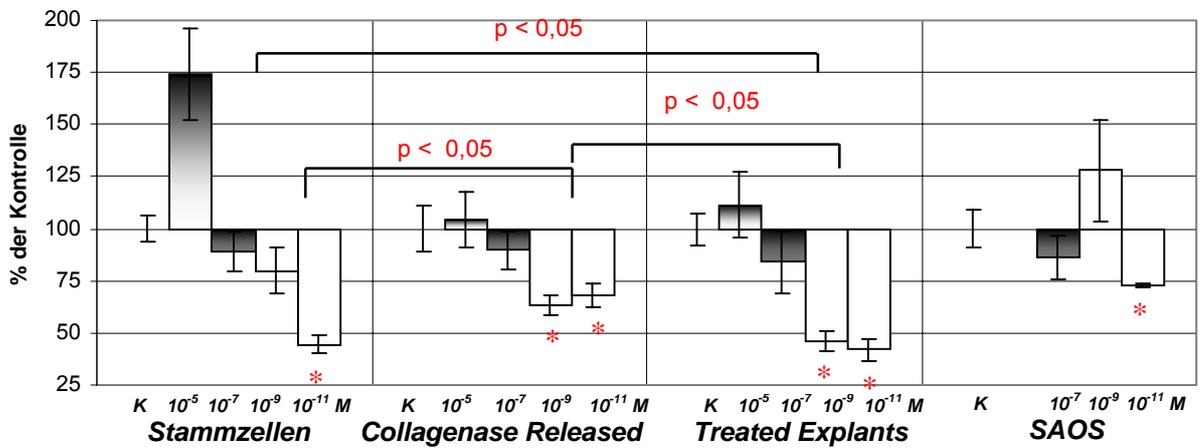


Grafik 25: Einfluss von Ibandronat auf die Proliferationsrate der humanen Osteoblasten. * = $p < 0,05$



Grafik 26: Einfluss von Ibandronat auf die Produktion der alkalischen Phosphatase von den humanen Osteoblasten. * = $p < 0,05$

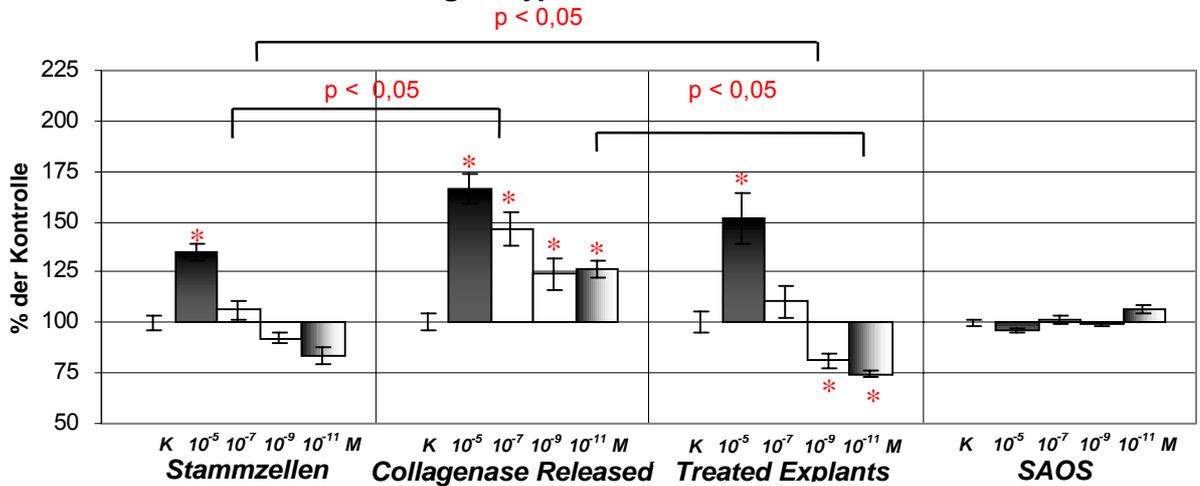
Interleukin-6 unter Ibandronat



Grafik 27: Einfluss von Ibandronat auf die Interleukin-6-Expression der humanen Osteoblasten.

* = $p < 0,05$

Kollagen Typ I unter Ibandronat



Grafik 28: Einfluss von Ibandronat auf die Prokollagenproduktion der humanen Osteoblasten.

* = $p < 0,05$

Ibandronat, wirkt in der Konzentration 10^{-3} M toxisch auf alle Zellen. In der Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M, sowie in niedrigeren Konzentrationen wirkt es proliferierend auf die normalen humanen Osteoblasten aller Reifungsstadien und signifikant stärker auf die Stammzellen.

Die Expression der alkalischen Phosphatase wird von Ibandronat bei allen Zellen stimuliert. Die Expression von alkalischer Phosphatase in den SAOS-Zellen wird statistisch signifikant unter Behandlung mit 10^{-7} M und 10^{-14} M 10^{-16} M Ibandronat gesteigert. Bei den Stammzellen stimulieren 10^{-11} M bis 10^{-13} M Ibandronat signifikant die Produktion von alkalischer Phosphatase. Die „collagenase released“ Zellen werden unter Behandlung mit 10^{-17} M Ibandronat und die „treated explants“ unter 10^{-5} M und 10^{-9} M zu signifikant erhöhter Produktion von alkalischer Phosphatase stimuliert. Hier sollte erwähnt werden, dass bei niedrigeren Konzentrationen (10^{-11} M bis 10^{-17} M) eine zunehmende Tendenz in der Produktion von alkalischer Phosphatase von allen Zellen besteht.

Die Expression des Il-6 wird unter Behandlung mit 10^{-11} M Ibandronat bei allen Zellen statistisch signifikant gehemmt (bei den „collagenase released Zellen und bei den „treated explants“ auch unter 10^{-9} M). Allerdings besteht bei der Ibandronatbehandlung ein biphasischer Effekt auf die Il-6 Produktion. Unter Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen: 10^{-13} M und 10^{-15} M bei den SAOS, 10^{-12} M und 10^{-15} M bei den Stammzellen und 10^{-15} M bei den „treated explants“ konnte ein stimulierender Effekt auf die Il-6-Produktion beobachtet werden, der signifikant stärker auf die Stammzellen war.

Die Kollagen Typ I-Produktion wird unter Ibandronatbehandlung (10^{-11} M) bei den SAOS stimuliert. Ebenso wird bei den Stammzellen, den „collagenase released“ und den „treated explants“ unter Behandlung mit 10^{-5} M bis 10^{-9} M Ibandronat die Kollagenproduktion stimuliert. Die Behandlung der „treated explants“ mit 10^{-11} M Ibandronat über 48 Stunden hemmt ihre Kollagenproduktion signifikant; in niedrigeren Konzentrationen wird eine ansteigende Tendenz beobachtet, die aber nicht signifikant ist.

Nach Ibandronatbehandlung bietet das Verhalten der Osteoblasten in den drei Reifungsstadien unter sich sowie im Vergleich zu den SAOS signifikante Unterschiede bezüglich Proliferation und Differenzierung.

Tab. 1: Zusammenfassung der Effekte der Bisphosphonatbehandlung in den physiologisch zu erwartenden Konzentrationen auf die humanen Osteoblasten. Der Pfeil (↑) veranschaulicht eine signifikante Zunahme, der Pfeil (↓) eine signifikante Abnahme der u.g. Parameter. Zwei entgegengesetzte Pfeile (↑↓) bedeuten einen biphasischen Effekt der Bisphosphonatbehandlung auf die humanen Osteoblasten.

<i>Bisphosphonate:</i>	<i>Etidronat</i>	<i>Alendronat</i>	<i>Ibandronat</i>
<i>Proliferation</i>			
SAOS	↓	↓	↓
Stammzellen	↔	↔	↑↓
Collagenase Released	↔	↔	↑
Treated Explants	↔	↔	↑
<i>Alkalische Phosphatase</i>			
SAOS	↓	↔	↑
Stammzellen	↓	↔	↑↓
Collagenase Released	↔	↔	↑↓
Treated Explants	↓	↔	↑
<i>Osteocalcin</i>			
SAOS	↓	↔	↑
Stammzellen			
Collagenase Released	↔	↔	↑
Treated Explants	↓	↔	↑
<i>Prokollagen Typ I</i>			
SAOS	↔	↑	↑
Stammzellen	↓	↓	↔
Collagenase Released	↔	↑	↑
Treated Explants	↓	↔	↑↓
<i>Interleukin 6</i>			
SAOS	↔	↔	↓
Stammzellen	↔	↓	↓
Collagenase Released	↓	↔	↓
Treated Explants	↔	↓	↓

5. Diskussion

Bisphosphonate sind neu angewandte Medikamente zur Bekämpfung einer Vielzahl von Knochenerkrankungen. Zu diesen gehören primäre und sekundäre Osteoporose, M. Paget, Hyperkalziämie, Knochenmetastasen, multiples Myelom, Osteogenesis imperfecta (69), ektopische Kalzifizierung des Weichgewebes (169) sowie sekundäre Osteopathien wie bei der Niereninsuffizienz, oder bei der rheumatoiden Arthritis. Der neue Knochen, nach Bisphosphonatbehandlung, weist im Vergleich zur Behandlung mit anderen verfügbaren Medikamenten (Calcitonin, Fluorid, u.a.) eine bessere Biomechanik, auf. Der genaue pharmakologische Mechanismus muss noch untersucht werden (155).

Allerdings gibt es einige Hinweise, die auf einen direkten Einfluss der Bisphosphonate auf andere Zellen der Knochenmikroumgebung und vor allem auf die Osteoblasten schließen lassen. So haben Bisphosphonate eine gute therapeutische Wirkung gegen Knochenerkrankungen, deren Pathophysiologie unabhängig von den Osteoklasten ist. Zweitens ist bekannt, dass das extrazelluläre anorganische Pyrophosphat sowie die Nukleosid-Phosphat-Pyrophosphatase, die seine Bildung steuert, eine wichtige Rolle in der Regulation der Knochenmineralisation über eine direkte Wirkung auf die Osteoblasten spielen (26).

Die vorbeschriebenen Versuche erforschen den direkten Effekt der Bisphosphonate auf die Osteoblasten. Unterschiede in der Wirkung von Bisphosphonaten verschiedener Generationen auf die humanen osteoblastischen Zellkulturmodelle werden beschrieben, sowie ein vermuteter Einfluss auf die parakrine Einwirkung der Osteoblasten auf die Osteoklasten überprüft.

5.1 Biochemische Marker des Knochenaufbaus

Es folgt eine kurze Skizzierung etablierter biochemischer Marker des Knochaufbaus, die ein valides Maß für den Knochenumsatz sind und anhand deren die Wirkung der Bisphosphonate auf die untersuchten Zelllinien diskutiert werden.

In unseren in-vitro Versuche wurden die alkalische Phosphatase, das Osteocalcin und das Kollagen Typ I gemessen, um die osteoblastäre Aktivität und Differenzierung zu beschreiben.

Die alkalische Phosphatase gilt als Indikator für die osteoblastäre Differenzierung von Knochenzellen z. B. in in vitro Kulturen. Sie gilt als klinischer biochemischer Indikator für Knochenaufbau und somit als Verlaufsparemeter bei M. Paget, Rachitis, Osteomalazie und renaler Osteodystrophie (180). Ihre wesentliche Rolle bei der Matrixmineralisation wird im Fall der Hypophosphatasie (Rathbun-Syndrom), einer seltenen vererblichen Erkrankung nach dem autosomalen rezessiven Typ deutlich. Die Krankheit wird durch ein Defekt der tns-ALP Aktivität charakterisiert, der zu Mineralisationsstörungen der Knochen und Zähne führt. Die Folgen schwanken zwischen intrauterinem Tod und wiederholten Frakturen im Erwachsenenleben (160, 184). Es wird vermutet, dass sie lokal die anorganische Phosphatkonzentration erhöht, oder dass sie als kalziumbindendes Protein bzw. Ca²⁺-ATPase wirkt. Zudem vernichtet die alkalische Phosphatase lokale Inhibitoren des Wachstums der Mineralkristallen. In vitro produzieren die Osteoblasten alkalische Phosphatase in großen Mengen erst wenn sie in der Kultur das Stadium der Konfluenz erreicht haben (23, 131).

Das Osteocalcin ist in der Knochenmatrix deponiert und stellt ein 10-20 % der nicht Kollagenproteine der Knochenmatrix (81) dar. Nur ein kleiner Teil zirkuliert im Blut. Serumosteocalcin ist ein sensibler und spezifischer Parameter der Osteoblastenaktivität. Sein Serumspiegel korreliert gut mit der histomorphometrisch nachweisbaren Knochenformation. Bei Patienten mit erniedrigtem Knochenaufbau finden sich erniedrigte Osteocalcinserumwerte (34, 174).

Es entsteht aus 49 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 5800 Dalton. In den meisten Spezies beinhaltet sein Molekül drei (am Ort 17, 21, und 24) γ -Karboxyglutamatsäurereste (Gla), weswegen es auch γ -Karboxyglutamatsäure beinhaltendes Protein, "bone Gla protein", (BGP) genannt wird. Die Karboxylgruppen der Gla binden das ionisierte Kalzium (62). Vitamin-K und CO₂ sind notwendig für die Karboxylierung der Glutamatsäurereste (46). Die Reaktion kann durch Warfarin inhibiert werden (80). Diese Vitamin-K Abhängigkeit ist ähnlich wie bei verschiedenen Gerinnungsfaktoren.

Seine Funktion ist noch nicht komplett aufgeklärt. Seine chemische Struktur lässt eine Interaktion mit dem Hydroxyapatit vermuten. Untersuchungen im embryonalen Knochen zeigen ein gleichzeitiges Auftreten des Osteocalcins mit dem Beginn der Mineralisation. Während des Skelettwachstums steigt die Proteinkonzentration parallel mit der Zunahme der Hydroxyapatitdeposition (19). In vitro dient Osteocalcin

als Indikator der Enddifferenzierung der Osteoblasten. Sein Synthese nimmt mit der Zunahme der Mineralisation und der Osteoblasten Differenzierung zu (78, 131). Es gibt allerdings Studien in vitro und in vivo, die einen Zusammenhang zwischen Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten und deren Vorstufen sowie Chemotaxis und Osteocalcinproduktion aufweisen (29).

Eine Osteocalcin “knock-out” Maus weist bemerkenswerterweise einen Phänotyp mit progredienter Zunahme der Knochenmasse sogar von guter biomechanischer Qualität auf. Dieses wurde auf eine Zunahme der Osteoblastenfunktion zurückgeführt ohne Zunahme der Osteoblastenzahl und ohne Einfluss auf die Osteoklasten oder die Mineralisation (38).

Das Osteoid besteht zu 90% aus Kollagen (hauptsächlich Kollagen Typ I), was im Osteoblast als pre-pro- α -Ketten synthetisiert wird. Kollagen Typ I entsteht aus zwei α 1-Ketten und eine α 2-Kette, die mit Hilfe von Disulfatverbindungen in einer Triplehelix konfiguriert sind. Das ist das Prokollagen, das vom rauen endoplasmatischen Retikulum in den Golgi Apparat zur Glykosilierung und anschließend in den extrazellulären Raum transportiert wird. Dort werden seine N- und C-terminalen Propeptide von speziellen Peptidasen gespalten und in die systemische Zirkulation gebracht. Die Kollagenmoleküle aggregieren und bilden die Kollagenfasern, die durch die kovalenten Cross-links verstärkt werden (176). Die Cross-links werden mit Wirkung von Lysiloxidasen katalysiert, die Aldehyde aus Lysin und Hydroxylisoseitenketten bilden. Gleichzeitig entstehen verschiedene Cross-linksreste, die u.a. Pyridinoline genannt werden. Wenn die Osteoklasten den Knochen abbauen, exprimieren sie saure und neutrale Proteasen, die die Kollagenfasern in molekulare Fragmente degradieren. Dabei entstehen zirkulierende Produkte wie Pyridinoline. Die ersten Fragmente werden in der Leber und in den Nieren metabolisiert und in Produkte mit niedrigem Molekulargewicht umgewandelt, damit sie im Urin ausgeschieden werden können. Zusammenfassend gibt es zwei Quellen für die zirkulierenden Peptide des Kollagen Typ I: die osteoblastäre Synthese der Knochenmatrix und die Spaltprodukte nach der Einwirkung der Osteoklasten (42).

Die Bestimmung von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ I im Zelllysat bzw. in den Zellüberständen ermöglicht eine effektive Einsätzung des Differenzierungsstadiums der humanen Osteoblasten und des Einflusses der Bisphosphonatbehandlung.

5.2 Reagibilität der humanen Osteoblasten auf Bisphosphonate

Zur Untersuchung der *in vitro* Reagibilität der humanen Osteoblasten auf Bisphosphonate ist eine lange Verdünnungsreihe angefertigt worden. Die toxische Konzentration (10^{-3} M), sowie äußerst niedrige Konzentrationen (bis 10^{-18} M) von Ibandronat, welches das höchste Wirkungspotential im Vergleich zu Etidronat und Alendronat hat, wurden untersucht. Um die *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Bedingungen zu übertragen, ist die Kenntnis der Pharmakologie der Bisphosphonate unerlässlich. Nach systemischer oder oraler Applikation verschwinden die Bisphosphonate rasch aus dem Plasma und binden sich spezifisch an die Hydroxyapatitkristalle im Knochen. Dort bleiben sie bis zu zehn Jahren, abhängig von der Spezies und dem Knochenumsatz (102). Die maximale Plasmakonzentration nach therapeutischer Anwendung von Ibandronat beträgt $3-6 \times 10^{-7}$ M (37). Wenn der Knochen, in dem die Bisphosphonate deponiert sind, resorbiert wird, werden sie in die Knochenmikroumgebung befreit und beeinflussen alle Knochenzellen (48). Die lokal erreichte Konzentration ist häufig untersucht worden. King et al haben Beagles Pamidronat verabreicht und die Konzentration im Sternum nach einem und zwei Jahre gemessen. Sie konnten im Durchschnitt 537 ng Pamidronat / mg Knochen, was $1,5 \times 10^{-9}$ mol / mg Knochen entspricht, nachweisen (96). Sato et al 1991 JCI setzten für ihre Versuche radioaktiv markiertes Alendronat ein. Sie haben *in vitro* eine Bindungskapazität von 105 nmol Alendronat / mg Knochen und eine Alendronatlokalisierung von 0,8 mM an der Osteoklastenoberfläche bei Rattenknochen gemessen. Hierbei wurden 72% des injizierten Medikaments auf der osteoklastären Oberfläche, 2% auf Oberflächen der Knochenformation und 13% in anderen Bereichen nachgewiesen (48, 161). Frühere Zellkulturuntersuchungen haben positive Effekte auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen unter Applikation von Bisphosphonaten in mikro - oder nanomolaren Konzentrationen beobachtet (25, 45). Garcia-Moreno et al demonstrierten, dass 2×10^{-9} M Alendronat die Resorptionskapazität der Osteoklasten um 50% inhibiert (64). In Anbetracht der o.g. Angaben sollten nur die Ergebnisse nach Stimulation im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-11} M benutzt werden, um die *in vivo* Effekte zu extrapolieren. Weitere Daten, nach Stimulation mit höheren *in vitro* Bisphosphonatkonzentrationen sind für die therapeutisch erreichbaren *in vivo*-Konzentrationen ohne Bedeutung. Daher werden

diese Daten trotz ihrer statistischen Signifikanz in den in vitro Versuchen nicht diskutiert.

Zusammenfassend weisen alle drei Bisphosphonate eine signifikante direkte Wirkung auf die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten auf. Diese Wirkung ist von dem verwendeten Bisphosphonat, der Dosierung, dem Reifungsstadium der Osteoblasten und dem Zellkulturmodell abhängig.

5.2.1 Etidronat

Unter Etidronatbehandlung in den physiologisch zu erwartenden Konzentrationen im Serum und in der Knochenmikroumgebung zeigt sich kein Einfluss auf die Proliferationsrate, weder bei den normalen humanen Osteoblasten in allen Reifungsstadien, noch bei den SAOS.

Die Differenzierung der Osteoblasten, beurteilt durch die Expression der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcins, wird bei allen Zelllinien signifikant supprimiert. Die Il-6 Expression wird bei den aktiven Osteoblasten signifikant und bei den Osteozyten tendenziell unter einer Behandlung mit 10^{-7} M supprimiert. Olmos et al haben ähnliche Ergebnisse vorgestellt. Sie inkubierten mit Lipopolysacchariden vorbehandelte SAOS- und MG63-Zellen mit 10^{-4} bis 10^{-7} M Etidronat und stellten eine Reduktion der Il-6 Produktion um 42% fest (129).

Bemerkenswert ist die dosisabhängige Suppression der Kollagenproduktion der Osteozyten. Aus der klinischen Anwendung von Etidronat ist bekannt, dass es zwar die ektopische Kalzifikation, aber auch die normale Knochenmineralisation hemmt (52). Längere Behandlung mit Etidronat führt zu Osteomalazie, die zur Frakturen führen kann (4, 171). Die Osteomalazie ist reversibel, wenn die Einnahme des Medikamentes unterbrochen wird (43). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Etidronat-induzierte Osteomalazie nicht nur durch die Inhibition der normalen Knochenmineralisation verursacht wird, sondern möglicherweise zusätzlich durch die Hemmung der osteoblastären Kollagenproduktion.

5.2.2 Alendronat

Alendronat zeigt eine positive proliferative Wirkung nur auf die aktiven Osteoblasten. Weiterhin stimuliert das Bisphosphonat der zweiten Generation die Differenzierung der Osteoblasten, vor allem der aktiven Osteoblasten und der SAOS.

Die Expression der alkalischen Phosphatase und die Kollagenproduktion spiegeln diese Effekte wieder. Auch unter Alendronat wird in vitro eine Reduktion der Kollagenproduktion beobachtet, die aber nur die Präosteoblasten und die „treated explants“ betrifft. Weiterhin wurde eine signifikante Reduktion der osteoblastären Interleukin-6 Produktion unter Alendronatbehandlung beobachtet.

In unseren in vitro Versuchen können wir bestätigen, dass Alendronat als ein Bisphosphonat der zweiten Generation durch seine gebesserte chemische Struktur im Vergleich zu Etidronat dem pharmakologischen Ziel der Bisphosphonate näher kommt. Es ist potenter indem es die Proliferation der Osteoblasten stimuliert. Zudem weist es eine geringere Reduktion der Kollagenproduktion und sogar eine Stimulation der Kollagenproduktion bei den aktiven Osteoblasten auf.

Diese potentere Wirkung von Alendronat verglichen mit Etidronat ist von verschiedenen Arbeitsgruppen bezogen auf die osteoklastäre Tätigkeit in vivo und in vitro beschrieben worden. Azuma et al haben in einem hyperkalziämischen in vivo Rattenmodell (mit 1 alpha(OH)D₃) und in einem in vitro Knochenresorptionsmodell (Elfenbeinscheiben) gezeigt, dass die niedrigste effektive Dosierung von Etidronat 25 mal höher war als die von Alendronat (9). In einer klinischen Studie wurden osteoporotische Frauen, nach erfolgloser Therapie mit Etidronat eingeschlossen. Nach intermittierender zyklischer Therapie über 3.3+/-0.4 Jahren wurde eine Reduktion der Knochendichte der Lumbalwirbelkörper und des proximalen Schenkels beobachtet. Daraufhin wurden sie auf 10 mg Alendronat täglich umgestellt. Sie wurden 1.3+/-0.1 Jahre lang therapiert. Anschließend wurde eine signifikante Zunahme der Knochendichte und der alkalische Phosphatase im Serum und eine Reduktion der Deoxycrosslinks im Urin festgestellt. Watts et al postulieren, dass Alendronat im Vergleich zu Etidronat eine komplettere Suppression der Knochenresorption und eine geringere Inhibition bzw. eine Stimulation der Knochenformation verursacht (182). Auch Menieur et al weisen nach, dass Alendronatbehandlung im Gegensatz zu Fluorid- oder Etidronatbehandlung das Frakturrisiko bei postmenopausalen osteoporotischen Frauen deutlich reduziert (121).

5.2.3 Ibandronat

Die Ibandronatwirkung unterscheidet sich in den o.g. in vitro Versuchen zwischen den verschiedenen Zelllinien. Auf die Proliferationsrate der Osteosarkomzellen wirkt

Ibandronat hemmend, mit zunehmender Wirkung je niedriger die Konzentration ist. Ibandronat wird klinisch gegen die maligne Hyperkalziämie eingesetzt (141); und eine Reduktion der knöchernen Metastasen bei Mamma- oder Prostatakarzinom wird berichtet (18). Unsere Ergebnisse weisen eine hemmende Wirkung auf die Zellen eines primären Knochentumors auf. In der aktuellen Literatur wurde für ein anderes Aminobisphosphonat der zweiten Generation, das Pamidronat, eine direkte hemmende Wirkung auf Osteosarkomzellen beschrieben. Dieser in vitro Effekt ist für eine potentielle klinische Anwendung bei primären Knochentumoren wie z. B. dem Osteosarkom interessant (173).

Bei den normalen humanen Osteoblasten in allen Reifungsstadien hat Ibandronat einen biphasischen Effekt. In den physiologisch zu erwartenden Konzentrationen zeigt es entweder keine proliferative Wirkung oder hemmt sogar die Proliferation (Stammzellen und „treated explants“) wobei in noch niedrigeren Konzentrationen ein deutlicher proliferativer Effekt nachzuweisen ist.

Weiterhin zeigt Ibandronat, im Vergleich zu den beiden anderen Bisphosphonaten der ersten und zweiten Generation einen stärker stimulierenden Effekt auf die Differenzierung der Osteoblasten, in allen Reifungsstadien. In physiologischen Konzentrationen wird die Expression von alkalischer Phosphatase und Kollagen gesteigert. Dagegen wird die Il-6-Expression in allen normalen humanen Osteoblasten und den Osteosarkomzellen gehemmt. Ibandronat weist somit nicht nur eine quantitativ höhere Wirkung im Vergleich zu den beiden anderen Bisphosphonaten der früheren Generationen auf, sondern auch eine qualitativ stärkere Wirkung, welche die Differenzierung der Osteoblasten induziert.

5.3 Bewertung des Zellkulturmodells

Die in vitro Kultivierung von Osteoblasten steht seit langem im Mittelpunkt der Erforschung der Knochenphysiologie. Das Altern und der konsekutive progressive Knochenverlust, der hauptsächlich die Reduktion des trabekulären Knochenvolumens betrifft, wird als Versagen der Osteoblasten interpretiert (22, 183). Dabei kann die Osteoklastenaktivität unverändert oder sogar vermehrt sein, was schließlich zu osteoporotischem Knochen führt. Viele Autoren beschreiben als Osteoporoseursache eine gehemmte Differenzierung der Osteoblastenvorläuferzellen zu reifen Osteoblasten in Kombination mit einer Dysfunktion der reifen Osteoblasten (10, 39, 128).

Die tierischen und die Osteosarkomzellkulturen sind ein adäquates Zellkulturmodell, bieten aber nur annähernd ein optimales Modell. Die Übertragung der Versuchsergebnisse in vivo ist äußerst schwer, da häufig widersprüchliche und abweichende Ergebnisse bei der Überprüfung derselben osteotropen Faktoren auf alle diese Kultursysteme beobachtet werden. Das erklärt sich dadurch, dass die aus tierischem Knochen oder aus tierischem bzw. humanem Tumorgewebe gewonnenen Zellen eigentlich nur osteoblastären Zellelementen entsprechen. Es sind die sogenannten osteoblast – like– cells, die kein einheitliches Verhalten, sondern unterschiedliche osteoblastäre Reifungs- und Differenzierungsgrade zeigen (15, 56, 151).

Die drei unterschiedlichen Zellpopulationen der normalen humanen Osteoblasten, die nach den in der Literatur beschriebenen Isolierungsmethoden gewonnen wurden, entsprechen einem standardisiertem in vitro Modell zur Untersuchung der verschiedenen Reifungsstadien der humanen Osteoblasten. Die phänotypischen Marker dieser Zellen im Sinne der Morphologie, der exprimierten Proteine und der Matrixmineralisation erleichtern ihre Charakterisierung nach der Isolation (3, 21). Die drei Differenzierungsstufen werden mit einer Genexpression, die anfangs die Zellproliferation, anschließend die Matrixformation und –reifung sowie letztlich die Matrixmineralisation bestimmt, definiert (147).

Das Verhalten der Zellen unterschiedlicher Reifungsstadien während unserer Versuche entsprachen den Literaturangaben. Die höchste Proliferationsrate wiesen die Präosteoblasten (28) auf, die unter Stimulation 180% der Kontrolle erreichten. Hier sollte allerdings noch einmal darauf hin gewiesen, dass es sich um eine reine in vitro Beobachtung handelt, weil in der physiologischen Knochenmikroumgebung die Bisphosphonatenkonzentration das Niveau von 10^{-4} M nicht erreichen kann. Die höchste basale Produktion der alkalischen Phosphatase boten die reifen Osteoblasten und die Osteozyten mit einer spezifischen Aktivität von 10 U// mg Protein. Die maximale Zunahme der Produktion der alkalischen Phosphatase wiesen die Osteozyten auf. Diese hatten auch die höchste basale Expression an Kollagen mit 60 ng/ml. Eine Osteocalcin – Expression war bei den Präosteoblasten auch unter Stimulationsbedingungen mit Bisphosphonaten nicht nachweisbar. Bei den anderen Osteoblasten konnte ebenso keine basale Expression von Osteocalcin gemessen werden. Allerdings unter Bisphosphonatstimulation stieg ihre Produktion bis zu 2 ng/ml bei den aktiven Osteoblasten und den Osteozyten.

Parallel zu den normalen humanen Osteoblasten wurden die Stimulationsversuche mit der immortalisierten Osteosarkomzelllinie SAOS durchgeführt. Der Phänotyp der malignen Zellen ist häufig verändert verglichen mit dem der originalen Zellen, dafür sind aber die Tumorzellen unsterblich. Die immortalisierten Osteosarkomzelllinien liefern somit ein über zahlreiche Passagen stabiles Zellkulturmodell, dessen Produkte gewebespezifisch sind und dessen zelluläre Mechanismen ähnlich den gesunden Zellen ablaufen. Die humanen Osteosarkomzelllinien sind den tierischen überlegen, aber ihre Vergleichbarkeit zu den normalen humanen Zellen wird ständig diskutiert. Eine spezifische Eigenschaft der Tumorzelllinien ist das „uncoupling“ von Proliferation und Differenzierung. Die Tumorzellen, die eine weitgehende Ausreifung aufweisen, zeigen ein nahezu unverändertes Proliferationsverhalten (152). Die SAOS Zellen weisen einen osteoblastären Charakter auf. Sie produzieren u.a. alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Osteocalcin, Fibronectin, Osteonectin, Proteinoglykane und reagieren mit erhöhter Produktion von cAMP und Osteocalcin auf Stimulation mit PTH und Vitamin-D₃. Sie gelten somit als reife Osteoblasten, die aber weiterhin ihre Tumoreigenschaften behalten.

Das Verhalten der SAOS – Zellen während den durchgeführten Versuchen entsprach zum größten Teil dem Charakter reifer Osteoblasten. Sie zeigen eine hohe basale Produktion an alkalischer Phosphatase 5 U//mg Protein, die sich unter Stimulation um 30% gegenüber der Kontrolle erhöhte. Die unstimulierte Osteocalcinproduktion lag unterhalb der Nachweisgrenze, konnte aber unter Bisphosphonatbehandlung im Zellüberstand, in gleich hohen Werten wie bei den normalen Osteoblasten, nachgewiesen werden. Die Kollagenproduktion der SAOS betrug 20 ng/ml und bot einen diskreten Anstieg unter Alendronat. Zusammenfassend wirkten die Bisphosphonate positiv stimulierend auf die Differenzierung der SAOS – Zellen, ähnlich wie bei den „collagenase released“ Osteoblasten. Dagegen hatten Bisphosphonate bei den Osteosarkomzellen einen signifikanten hemmenden Effekt auf die Proliferation. Dieses Verhalten: Zunahme der Differenzierungsprodukte versus negative proliferierende Wirkung entspricht dem Verhalten von Zellen im Enddifferenzierungsstadium. Allerdings wurde in unseren Versuchen ein unterschiedliches Reaktionsmuster zwischen den SAOS und der Collagenase released sowie den treated explants beobachtet. Diese Beobachtungen erstärken die These vieler Knochenforscher, dass die Osteosarkomkulturen nur annähernd einem osteoblastären Modell entsprechen (55, 154).

5.4 Einfluss der Bisphosphonatbehandlung auf die osteoblastäre Interleukin-6-Expression

Interleukin-6 ist ein Mediator unseres Immunsystems mit einer großen Breite biologischer Funktionen. Es ist bekannt u.a. auch als B-Zellen- und Hepatozyten-Stimulationsfaktor, Hybridoma-Wachstumsfaktor sowie zytolytischer Differenzierungsfaktor für die T-Zellen. Das IL-6 cDNA kodiert ein Polypeptid aus 212 Aminosäuren. Dieses wird zu einem reifen Protein mit 184 Aminosäuren gespalten. Es existieren verschiedene Stufen von Glykosilierung und Phosphorylierung, somit schwankt sein Molekulargewicht zwischen 21,5 und 28 kDa. IL-6 wird von Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, T-Zellen und vielen Tumorzelllinien exprimiert. Erhöhte Serumkonzentration kommt bei verschiedenen Krankheiten wie Sepsis (76), Autoimmunerkrankungen, Lymphomen, AIDS, alkoholische Lebererkrankung, Infektionen und während Transplantatrejektionen vor (84, 87).

Interleukin-6-Serumkonzentration korreliert stark mit dem Alter und steigt um das dreifache während des Lebens. Allerdings wurde keine direkte Korrelation zwischen IL-6 Konzentration und Knochenmasse festgestellt (95). IL-6 wird unter anderem auch von den Osteoblasten produziert und fördert die Rekrutierung und Differenzierung der Osteoklasten. Es induziert in der Knochenmikroumgebung seine eigene Synthese in den Osteoblasten über Transkriptionsmechanismen mit positivem Feedback (57). Eine parakrine Wirkung der Osteoblasten und ihrer Stammzellen, die Interleukin-6 produzieren, auf die Osteoklasten und ihrer Vorläuferzellen ist bekannt (27, 88, 104, 107). Sowohl in humanen normalen Osteoblasten, als in SAOS-2 und in osteoblast-like Zellen aus Knochen mit M. Paget konnte mRNA der IL-6 entsprechend isoliert werden (16). Östrogene in vitro hemmen die Produktion von IL-6 und wirken somit antiosteoporotisch (68). In Tierversuchen mit Mäusen wurde eine erhöhte Produktion von IL-6 nach Ovariectomie festgestellt (133). Poli et al 1994 zeigten, dass IL-6 „knoch-out“ Mäuse keinen Verlust an trabekulärem Knochen nach Ovariectomie aufweisen (138).

Ein weiteres Ziel unserer Studie ist die Untersuchung einer potentiellen parakrinen Wirkung der Bisphosphonate auf die Osteoklasten über die osteoblastäre IL-6-Expression (115).

Wir haben nach Behandlung mit Bisphosphonaten in physiologischen Konzentrationen eine Inhibition der Il-6-Expression sowohl bei den normalen humanen Osteoblasten als auch bei den Osteosarkomzellen beobachtet. Diese in vitro Beobachtungen korrelieren mit dem klinischen Wissen, dass die Behandlung mit Bisphosphonaten eine gute therapeutische Wirkung bei M. Paget (157), postmenopausale (116) oder steroid-induzierte Osteoporose (117) sowie bei anderen Knochenerkrankungen zeigt, deren Pathomechanismus eine erhöhte Il-6-Produktion bedingt.

Im Gegensatz hierzu verursacht die Behandlung der Zellen mit höheren nicht physiologischen Konzentrationen eine signifikant stärkere Stimulation der Il-6-Expression. Nach einer intravenösen Applikation oder nach Resorption des Osteoids unter der „ruffled boarder“ der Osteoklasten ist es möglich, dass die benachbarten Osteoblasten kurzfristig mit solch hohen Bisphosphonatkonzentrationen in Kontakt kommen. Aufgrund der Kenntnis, dass sich nur 2% vom absorbierten Bisphosphonat in Regionen der Knochenformation befinden (161), scheint es aber eher unwahrscheinlich, dass die lokale Bisphosphonatenkonzentration nach Osteoidadsorption ein so hohes Niveau erreicht.

Osteoblasten, hauptsächlich osteoblastäre Vorläuferzellen, können möglicherweise hohen Konzentrationen direkt nach intravenöser Applikation von Bisphosphonaten ausgesetzt sein. Die gesteigerte osteoblastäre Il-6-Produktion nach in vitro Behandlung mit den höchsten Konzentrationen von Bisphosphonaten könnte eher mit der vorübergehenden febrilen Reaktion und den hämatologischen Veränderungen, passend zu einer Akute-Phase-Reaktion korrelieren, die manchen Patienten nach Bisphosphonatapplikation bieten. Il-6 gehört zu den wichtigen Mediatoren der akuten entzündlichen Reaktion (118). Diese o.g. Patienten weisen eine erhöhte zirkulierende Il-6-Bioaktivität auf (168). Weitere in vitro Experimente zeigen ferner eine erhöhte Il-6-Expression der humanen Monozyten im peripheren Blut unter Bisphosphonatbehandlung (137, 162), die ebenfalls bei der Akute-Phase-Reaktion eine Rolle spielen könnte.

Weiterhin scheint Il-6 eine wichtige Rolle bei den Knochenneoplasien zu spielen, indem es wie andere Wachstumsfaktoren und Zytokine osteolytische Knochenmetastasen induziert. Tsingotjidou et al beobachten, dass Prostatatumorzellen, die in SCID Mäuse nahe an Implantationsstellen von humanem Knochen injiziert wurden, deren Eigenschaft zu metastasieren verstärkt haben,

indem sie eine osteolytische Antwort des gesunden implantierten Knochens über Il-6 induziert haben (177).

Ähnliche Experimente demonstrieren nachweisbare Il-6-Konzentrationen in SCID Mäusen, in die Plasmazytomzellen injiziert wurden. Dies spricht für eine Regulation des Wachstums der Plasmazytomzellen, sowie deren „homing“ in den Knochen über Il-6 (178). In unseren in vitro Versuchen haben wir nach Behandlung der Osteoblasten in physiologisch relevanten und therapeutisch zu erwartenden Konzentrationen eine starke Reduktion der Il-6-Expression der normalen humanen Osteoblasten in allen Differenzierungsstadien beobachtet. In der klinischen Erfahrung sind Erfolge mit der Bisphosphonatbehandlung bei Patienten mit Plasmazytom beschrieben worden. Eine Reduktion der Knochenmetastasen bei Patienten mit Prostata- und Mammakarzinom konnte beobachtet werden (35, 36, 93, 99). Die Suppression der osteoblastären Il-6-Expression unter Bisphosphonatbehandlung könnte der Inhibition der metastatischen Osteolyse dienen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der Bisphosphonate auf Osteoblasten erforscht, ferner ist die indirekte Wirkung der Bisphosphonate auf die Osteoklasten Untersuchungsgegenstand. Die Beeinflussung der Osteoblastenaktivität durch Bisphosphonate wird seit langem vermutet, da therapeutische Effekte bei der Behandlung von Knochenerkrankungen mit osteoblastärer Dysfunktion sowie bei Erkrankungen mit einer erhöhten Freisetzung von Interleukin-6 bekannt sind. Il-6 lässt sich in der Knochenmikroumgebung nachweisen, wird von Osteoblasten exprimiert und fördert u.a. die osteoklastäre Rekrutierung und Differenzierung.

Die Versuche wurden an standardisierten humanen Osteosarkomzelllinien mit osteoblastären Eigenschaften, an den SAOS sowie an drei Kulturen normaler humaner Osteoblasten in unterschiedlichen Reifungsstadien vorgenommen. Die humanen Osteoblasten wurden vom Primärgewebe, gewonnen während elektiver knochenchirurgischen Eingriffe, isoliert.

Für die Stimulationsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bisphosphonate Etidronat, Alendronat und Ibandronat gewählt. Sie sind Vertreter der ersten, zweiten und dritten Bisphosphonatgeneration. Um den Dosis-Wirkungs-Effekt zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen bis 10^{-18} M gemäß dem Wirkungspotential der Medikamente angefertigt.

Zur Auswertung wurden die Proliferation und Differenzierung der Zellen nach Bisphosphonatbehandlung mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Proliferation wurde mit dem MTT-Assay; die Differenzierung wurde anhand der Expression von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin sowie Kollagen Typ I untersucht. Die vermutete parakrine osteoblastäre Wirkung auf die Osteoklasten wurde erforscht, in dem das Interleukin-6 im Zellüberstand bestimmt wurde.

- Alle drei Bisphosphonate weisen eine signifikante direkte Wirkung auf die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten auf.
- Diese Wirkung ist von dem verwendeten Bisphosphonat, der Dosierung, dem Reifungsstadium der Osteoblasten und dem Zellkulturmodell abhängig.
- Des weiteren verursachen alle Bisphosphonate in physiologischen Konzentrationen eine Reduktion der Il-6-Expression bei allen Osteoblasten und bei den SAOS.

Das Reaktionsmuster ist abhängig von der Generation des Bisphosphonats:

- Etidronat beeinflusst die Proliferation der normalen humanen Osteoblasten nicht, die Proliferationsrate der Osteosarkomzellen wird reduziert. Zudem hat Etidronat eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung der normalen humanen Osteoblasten; die Kollagenproduktion wird am stärksten supprimiert. Diese in vitro Feststellung korreliert mit der Etidronat-induzierten Osteomalazie, die sowohl bei Ratten als auch bei Menschen nach langfristiger Etidronateinnahme berichtet wird.
- Alendronat hemmt die Proliferationsrate der SAOS hat aber keinen Effekt auf die Proliferation der normalen humanen Osteoblasten. Was die Differenzierung der Osteoblasten angeht, hat Alendronat keinen signifikanten Effekt auf die Expression von alkalischer Phosphatase oder Osteocalcin; stimuliert jedoch die Produktion von Kollagen bei SAOS und „collagenase released“ Osteoblasten. Alendronat hemmt die Il-6-Expression bei den osteoblastären Stammzellen und bei den „treated explants“.
- Ibandronat, ein Bisphosphonat der dritten Generation, hemmt die Proliferation der SAOS. Auf die normalen humanen Osteoblasten hat es eine proliferierende Wirkung. Es fördert die Produktion von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ I. Die Il-6-Expression wird bei allen Zellen unter Ibandronatbehandlung reduziert. Ibandronat weist eine quantitativ höhere Wirkung im Vergleich zu den beiden anderen Bisphosphonaten der früheren Generationen auf, sowie eine qualitativ stärkere Wirkung, welche die Differenzierung der Osteoblasten induziert.

Zusätzliches Ziel dieser Arbeit war das in-vitro Verhalten einer Osteosarkomzelllinie gegenüber dem von normalen humanen Osteoblasten zu untersuchen. Die SAOS gelten als ein stabiles Zellkulturmodell reifen osteoblastären Charakters. Verglichen mit dem Verhalten der normalen humanen Osteoblasten (auch dieser im fortgeschrittenen Reifungsstadium) unter Bisphosphonatbehandlung wurden deutliche Unterschiede im Reaktionsmuster bezüglich Proliferation und Differenzierung festgestellt.

Die Verwendung transformierter Zelllinie als in vitro Modell der Knochenzellfunktion ist somit kritisch zu bewerten.

Aufgrund der hemmenden proliferativen Wirkung aller Bisphosphonate auf die SAOS Zellen wäre die mögliche therapeutische Anwendung von Bisphosphonaten gegen primäre Knochentumoren zu untersuchen.

Die Reduktion der osteoblastären IL-6-Expression unter Bisphosphonatbehandlung deutet darauf hin, dass eine parakrine Wirkung der Osteoblasten auf die Osteoklasten der Knochenmikroumgebung existiert. Dieses Erkenntnis könnte den pharmakologischen Wirkungsmechanismus der Bisphosphonate erklären, dass bei Knochenerkrankungen mit erhöhtem IL-6-Spiegel wie z. B. der postmenopausalen Osteoporose, dem M. Paget sowie der ossären Metastasierung. eine positive Krankheitsbeeinflussung in der klinischen Praxis festgestellt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass der therapeutische Ansatz der Bisphosphonate bei Knochenerkrankungen einem vielschichtigen Wirkprinzip beruht, dessen einzelne Seiten in weiteren Studien erforscht werden sollten.

7. Literaturverzeichnis

1. Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 90 (1): 107-10., 1991.
2. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55 (3): 287-99., 1994.
3. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Ann Periodontol* 3 (1): 350-69, 1998.
4. Adami S, Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf* 14 (3): 158-70., 1996.
5. Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, Perrone MH. Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 33 (11): 1657-63., 1992.
6. Amling M, Dellling G. [Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption]. *Pathologe* 17 (5): 358-67., 1996.
7. Anderson HC, Sugamoto K, Morris DC, Hsu HH, Hunt T. Bone-inducing agent (BIA) from cultured human Saos-2 osteosarcoma cells. *Bone Miner* 16 (1): 49-62., 1992.
8. Antic VN, Fleisch H, Muhlbauer RC. Effect of bisphosphonates on the increase in bone resorption induced by a low calcium diet. *Calcif Tissue Int* 58 (6): 443-8., 1996.
9. Azuma Y, Sato H, Oue Y, Okabe K, Ohta T, Tsuchimoto M, Kiyoki M. Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. *Bone* 16 (2): 235-45., 1995.

10. Balena R, Shih MS, Parfitt AM. Bone resorption and formation on the periosteal envelope of the ilium: a histomorphometric study in healthy women. *J Bone Miner Res* 7 (12): 1475-82., 1992.
11. Basha B, Rao DS, Han ZH, Parfitt AM. Osteomalacia due to vitamin D depletion: a neglected consequence of intestinal malabsorption. *Am J Med* 108 (4): 296-300., 2000.
12. Battmann A. Menschliche Osteozytenkulturen: Ein Biomodell der Knochenzellfunktion. Inauguraldisertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen., 1991.
13. Battmann A, Jundt G, Schulz A. Endosteal human bone cells (EBC) show age-related activity in vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105 (2): 98-102, 1997.
14. Benayahu D, Kletter Y, Zipori D, Wientroub S. Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo. *J Cell Physiol* 140 (1): 1-7., 1989.
15. Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* 5 (5): 229-34, 1984.
16. Birch MA, Ginty AF, Walsh CA, Fraser WD, Gallagher JA, Bilbe G. PCR detection of cytokines in normal human and pagetic osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 8 (10): 1155-62, 1993.
17. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Bauer DC, Genant HK, Haskell WL, Marcus R, Ott SM, Torner JC, Quandt SA, Reiss TF, Ensrud KE. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 348 (9041): 1535-41., 1996.

18. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magonetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 60 (11): 2949-54., 2000.
19. Boivin G, Morel G, Lian JB, Anthoine-Terrier C, Dubois PM, Meunier PJ. Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417 (6): 505-12, 1990.
20. Boonekamp PM, Lowik CW, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep ML, Bijvoet OL. Enhancement of the inhibitory action of APD on the transformation of osteoclast precursors into resorbing cells after dimethylation of the amino group. *Bone Miner* 2 (1): 29-42., 1987.
21. Brand JS, Hefley TJ, Collagenase and the isolation of cells from bone, *Cell Separations: Methods and Selected Applications*, Vol 3, Seiten 265-83, 1984
22. Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg T. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8 (3): 157-64, 1987.
23. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17 (4): 333-68., 1996.
24. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 337 (2): 91-5., 1997.

25. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest* 85 (2): 456-61., 1990.
26. Caswell AM, Russell RG. Evidence that ecto-nucleoside-triphosphate pyrophosphatase serves in the generation of extracellular inorganic pyrophosphate in human bone and articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 966 (3): 310-7, 1988.
27. Chaudhary LR, Spelsberg TC, Riggs BL. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha: lack of regulation by 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 130 (5): 2528-34, 1992.
28. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134 (1): 277-86., 1994.
29. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 127 (4): 1149-58., 1994.
30. Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 441-83, 1992.
31. Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int* 2 (6): 285-9., 1992.
32. Davis KD, Attie MF. Management of severe hypercalcemia. *Crit Care Clin* 7 (1): 175-90., 1991.
33. Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Bone Morphogenetic Proteins Stimulate

Angiogenesis through Osteoblast- Derived Vascular Endothelial Growth Factor A. *Endocrinology* 143 (4): 1545-53., 2002.

34. Delmas PD, Glorieux FH, Delvin EE, Salle BL, Melki I. Perinatal serum bone Gla-protein and vitamin D metabolites in preterm and fullterm neonates. *J Clin Endocrinol Metab* 65 (3): 588-91., 1987.
35. Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R. 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 (12): 2048-56., 1999.
36. Diel IJ, Solomayer EF, Bastert G. Bisphosphonates and the prevention of metastasis: first evidences from preclinical and clinical studies. *Cancer* 88 (12 Suppl): 3080-8., 2000.
37. Dooley M, Balfour JA. Ibandronate. *Drugs* 57 (1): 101-8; discussion 109-10, 1999.
38. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382 (6590): 448-52., 1996.
39. Egrise D, Martin D, Neve P, Vienne A, Verhas M, Schoutens A. Bone blood flow and in vitro proliferation of bone marrow and trabecular bone osteoblast-like cells in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 50 (4): 336-41., 1992.
40. Elford PR, Guenther HL, Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Transforming growth factor-beta reduces the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells in monolayer culture. *Bone* 8 (4): 259-62, 1987.
41. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res* 11 (3): 300-5., 1996.

42. Eyre DR, Koob TJ, Van Ness KP. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high- performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 137 (2): 380-8., 1984.
43. Eyres KS, Marshall P, McCloskey E, Douglas DL, Kanis JA. Spontaneous fractures in a patient treated with low doses of etidronic acid (disodium etidronate). *Drug Saf* 7 (2): 162-5., 1992.
44. Farley JR, Kyeyune-Nyombi E, Tarbaux NM, Hall SL, Strong DD. Alkaline phosphatase activity from human osteosarcoma cell line SaOS-2: an isoenzyme standard for quantifying skeletal alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 35 (2): 223-9., 1989.
45. Felix R, Guenther HL, Fleisch H. The subcellular distribution of [14C]dichloromethylenebisphosphonate and [14C]1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate in cultured calvaria cells. *Calcif Tissue Int* 36 (1): 108-13., 1984.
46. Fernlund P, Stenflo J, Roepstorff P, Thomsen J. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. V. Gamma-carboxyglutamic acids, the vitamin K-dependent structures in prothrombin. *J Biol Chem* 250 (15): 6125-33., 1975.
47. Fleisch H. *Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient.* Forth Edition 2000.
48. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 42 (6): 919-44., 1991.
49. Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res* 116: 1-28, 1989.
50. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res* 29 (3): 145-50., 1997.

51. Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Relat Res* 3 (4-5): 279-87, 1981.
52. Fleisch H. Mechanisms of action of the bisphosphonates. *Medicina (B Aires)* 57 (Suppl 1): 65-75., 1997.
53. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S, Muhlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1 (1): 12-8., 1970.
54. Fogh J, Trempe G in: *Human Tumor Cell Lines in vitro: New human tumor cell lines*. Plenum Press, New York:115-59
55. Fohr B, Schulz A, Battmann A. Sex steroids and bone metabolism: comparison of in vitro effects of 17beta-estradiol and testosterone on human osteosarcoma cell lines of various gender and differentiation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108 (6): 414-23, 2000.
56. Fohr B. Einfluß von Sexualhormonen auf humane Osteosarkomzellen in vitro: Eine Basisstudie zur Rolle gonadaler Hormone bei der Entstehung der Osteoporose. Inauguraldisertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen.,1997.
57. Franchimont N, Rydziel S, Canalis E. Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 100 (7): 1797-803, 1997.
58. Francis MD, Russell RG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 165 (899): 1264-6., 1969.
59. Freshney RI. *Tierische Zellkulturen, ein Methodenhandbuch*, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York; 233-235, 1990.

60. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12 (9): 1358-67., 1997.
61. Fujita T. Parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. *BioDrugs* 15 (11): 721-8, 2001.
62. Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med* 302 (26): 1460-6., 1980.
63. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 11 (11): 1619-27., 1996.
64. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mellibovsky L, Nogues X, Ballester J, Aubia J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 22 (3): 233-9., 1998.
65. Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA, Avila-Alvarenga S, Rivas MJ, Soilan J, Penedo M. Coeliac disease and osteomalacia: an association still present in Western countries. *Rheumatology (Oxford)* 39 (12): 1435., 2000.
66. Garnero P, Darté C, Delmas PD. A model to monitor the efficacy of alendronate treatment in women with osteoporosis using a biochemical marker of bone turnover. *Bone* 24 (6): 603-9, 1999.
67. Gerakis A, Hadjidakis D, Kokkinakis E, Apostolou T, Raptis S, Billis A. Correlation of bone mineral density with the histological findings of renal osteodystrophy in patients on hemodialysis. *J Nephrol* 13 (6): 437-43., 2000.
68. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-

- derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89 (3): 883-91, 1992.
69. Glorieux FH. Bisphosphonate therapy for severe osteogenesis imperfecta. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 2: 989-92., 2000.
 70. Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J Bone Miner Res* 17 (1): 30-8., 2002.
 71. Gomez B, Jr., Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 41 (11): 1560-6., 1995.
 72. Gothlin G, Ericsson JL. Fine structural localization of alkaline phosphomonoesterase in the fracture callus of the rat. *Isr J Med Sci* 7 (3): 488-90., 1971.
 73. Graepel P, Bentley P, Fritz H, Miyamoto M, Slater SR. Reproduction toxicity studies with pamidronate. *Arzneimittelforschung* 42 (5): 654-67., 1992.
 74. Greenfield EM, Goldberg VM. Genetic determination of bone density. *Lancet* 350 (9087): 1263-4., 1997.
 75. Gundle R, Beresford JN. The isolation and culture of cells from explants of human trabecular bone. *Calcif Tissue Int* 56 (Suppl 1): S8-10., 1995.
 76. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74 (5): 1704-10., 1989.
 77. Hansen NM, Felix R, Bisaz S, Fleisch H. Aggregation of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* 451 (2): 549-59., 1976.

78. Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 10 (2): 178-86., 1995.
79. Haslam SI, Van Hul W, Morales-Piga A, Balemans W, San-Millan JL, Nakatsuka K, Willems P, Haites NE, Ralston SH. Paget's disease of bone: evidence for a susceptibility locus on chromosome 18q and for genetic heterogeneity. *J Bone Miner Res* 13 (6): 911-7., 1998.
80. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 21 (10): 2538-47., 1982.
81. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (10): 3925-9., 1975.
82. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13 (1): 81-8, 1992.
83. Hinrichs B, Dreyer T, Battmann A, Schulz A. Histomorphometry of active osteoblast surface labelled by antibodies against non-collagenous bone matrix proteins. *Bone* 14 (3): 469-72., 1993.
84. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6 [see comments]. *Immunol Today* 11 (12): 443-9, 1990.
85. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15 (1): 2-12., 2000.
86. Hosain F, Spencer RP, Couthon HM, Sturtz GL. Targeted delivery of antineoplastic agent to bone: biodistribution studies of technetium-99m-labeled gem-bisphosphonate conjugate of methotrexate. *J Nucl Med* 37 (1): 105-7., 1996.

87. Hummel M, Czerlinski S, Friedel N, Liebenthal C, Hasper D, von Baehr R, Hetzer R, Volk HD. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. *Crit Care Med* 22 (3): 448-54., 1994.
88. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145 (10): 3297-303, 1990.
89. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. Evidence for autonomy from factors released during bone resorption. *J Clin Invest* 101 (9): 1942-50, 1998.
90. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation
91. Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 7 (5): 501-12., 1992.
92. Kanis JA, Adami S. Bone loss in the elderly. *Osteoporos Int* 4 (Suppl 1): 59-65., 1994.
93. Kanis JA, McCloskey EV. Bisphosphonates in multiple myeloma. *Cancer* 88 (S12): 3022-3032., 2000.
94. Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9 (8): 1137-41., 1994.
95. Khosla S, Peterson JM, Egan K, Jones JD, Riggs BL. Circulating cytokine levels in osteoporotic and normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (3): 707-11., 1994.

96. King LE, Grynblas MD, Tomlinson G, Vieth R. Pamidronate content and turnover in sternum, vertebral body, and iliac bones of dogs. *Bone* 20 (5): 405-11., 1997.
97. Knuchel R, Hofstadter F. [In vitro culture: from tissue to cell line]. *Pathologie* 15 (3): 141-9., 1994.
98. Kumar R. Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. *Bone* 27 (3): 333-8., 2000.
99. Kurebayashi J. Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. *Breast Cancer* 7 (2): 124-9, 2000.
100. Lau KH, Baylink DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. *J Bone Miner Res* 13 (11): 1660-7., 1998.
101. Lerner UH, Larsson A. Effects of four bisphosphonates on bone resorption, lysosomal enzyme release, protein synthesis and mitotic activities in mouse calvarial bones in vitro. *Bone* 8 (3): 179-89, 1987.
102. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18 (2): 75-85., 1996.
103. Lindsay R. Fluoride and bone--quantity versus quality. *N Engl J Med* 322 (12): 845-6., 1990.
104. Littlewood AJ, Russell J, Harvey GR, Hughes DE, Russell RG, Gowen M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. *Endocrinology* 129 (3): 1513-20, 1991.
105. Lombardi A. Treatment of Paget's disease of bone with alendronate. *Bone* 24 (5 Suppl): 59S-61S, 1999.

106. Lowe CE, Depew WT, Vanner SJ, Paterson WG, Meddings JB. Upper gastrointestinal toxicity of alendronate. *Am J Gastroenterol* 95 (3): 634-40., 2000.
107. Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, Papapoulos SE. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 162 (3): 1546-52, 1989.
108. Lowik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 3 (2): 185-92., 1988.
109. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75, 1951.
110. Lutton JD, Moonga BS, Dempster DW. Osteoclast demise in the rat: physiological versus degenerative cell death. *Exp Physiol* 81 (2): 251-60., 1996.
111. Magnetto S, Boissier S, Delmas PD, Clezardin P. Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. *Int J Cancer* 83 (2): 263-9., 1999.
112. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 158 (3): 555-72., 1994.
113. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254 (2): 317-30., 1988.

114. Manolagas SC. Cellular and molecular mechanisms of osteoporosis. *Aging (Milano)* 10 (3): 182-90, 1998.
115. Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 840: 194-204, 1998.
116. Manolagas SC, Bellido T, Jilka RL. New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130. *Int J Immunopharmacol* 17 (2): 109-16., 1995.
117. Manolagas SC, Weinstein RS. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis[Editorial]. *J Bone Miner Res* 14 (7): 1061-6, 1999.
118. Marchini G, Berggren V, Djilali-Merzoug R, Hansson LO. The birth process initiates an acute phase reaction in the fetus-newborn infant. *Acta Paediatr* 89 (9): 1082-6., 2000.
119. McKane WR, Khosla S, Peterson JM, Egan K, Riggs BL. Circulating levels of cytokines that modulate bone resorption: effects of age and menopause in women. *J Bone Miner Res* 9 (8): 1313-8, 1994.
120. Meunier PJ. Anabolic agents for treating postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine* 68 (6): 576-81., 2001.
121. Meunier PJ. Evidence-based medicine and osteoporosis: a comparison of fracture risk reduction data from osteoporosis randomised clinical trials. *Int J Clin Pract* 53 (2): 122-9, 1999.
122. Migliaccio S, Davis VL, Gibson MK, Gray TK, Korach KS. Estrogens modulate the responsiveness of osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) stably transfected with estrogen receptor. *Endocrinology* 130 (5): 2617-24., 1992.

123. Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS. Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 198 (2): 163-73., 1980.
124. Mills BG, Frausto A, Singer FR, Ohsaki Y, Demulder A, Roodman GD. Multinucleated cells formed in vitro from Paget's bone marrow express viral antigens. *Bone* 15 (4): 443-8., 1994.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63., 1983.
126. Muhlbauer RC, Bauss F, Schenk R, Janner M, Bosies E, Strein K, Fleisch H. BM 21.0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* 6 (9): 1003-11., 1991.
127. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66 (4): 855-86., 1986.
128. Nishida H, Matsui H, Sugiura H. [Effects of exercise and calcium-intake on bone hardness and bone constituents in aged mice]. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 39 (4): 205-13., 1992.
129. Olmos JM, De Vega T, Perera L, Riancho JA, Amado JA, Gonzalez-Macias J. Etidronate inhibits the production of IL-6 by osteoblast-like cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21 (8): 519-22., 1999.
130. Orwoll ES, Stribrska L, Ramsey EE, Keenan EJ. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int* 49 (3): 183-7., 1991.
131. Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ, et al. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (24): 9990-4., 1990.

132. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 47 (22): 5875-9., 1987.
133. Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* 133 (2): 822-8, 1993.
134. Pecherstorfer M, Jilch R, Sauty A, Horn E, Keck AV, Zimmer-Roth I, Thiebaud D. Effect of first treatment with aminobisphosphonates pamidronate and ibandronate on circulating lymphocyte subpopulations. *J Bone Miner Res* 15 (1): 147-54., 2000.
135. Pelorgeas S, Martin JB, Satre M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. A ³¹P NMR study. *Biochem Pharmacol* 44 (11): 2157-63., 1992.
136. Pfeilschifter J, Diel I, Pilz U, Brunotte K, Naumann A, Ziegler R. Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J Bone Miner Res* 8 (6): 707-17., 1993.
137. Pietschmann P, Stohlawetz P, Brosch S, Steiner G, Smolen JS, Peterlik M. The effect of alendronate on cytokine production, adhesion molecule expression, and transendothelial migration of human peripheral blood mononuclear cells. *Calcif Tissue Int* 63 (4): 325-30., 1998.
138. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Costantini F. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *Embo J* 13 (5): 1189-96, 1994.
139. Pols HA, Felsenberg D, Hanley DA, Stepan J, Munoz-Torres M, Wilkin TJ, Qin-sheng G, Galich AM, Vandormael K, Yates AJ, Stych B. Multinational,

- placebo-controlled, randomized trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: results of the FOSIT study. Foxamax International Trial Study Group. *Osteoporos Int* 9 (5): 461-8, 1999.
140. Prallet B, Male P, Neff L, Baron R. Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 7 (4): 405-14., 1992.
141. Ralston SH, Thiebaud D, Herrmann Z, Steinhauer EU, Thurlimann B, Walls J, Lichinitser MR, Rizzoli R, Hagberg H, Huss HJ, Tubiana-Hulin M, Body JJ. Dose-response study of ibandronate in the treatment of cancer-associated hypercalcaemia. *Br J Cancer* 75 (2): 295-300, 1997.
142. Randall JC, Morris DC, Zeiger S, Masuhara K, Tsuda T, Anderson HC. Presence and activity of alkaline phosphatase in two human osteosarcoma cell lines. *J Histochem Cytochem* 37 (7): 1069-74, 1989.
143. Reginster JY. Calcitonin and bone diseases. *Lancet* 339 (8800): 1064-5., 1992.
144. Reginster JY, Deroisy R, Fontaine MA, Franchimont P. Influence of estrogen replacement therapy on endogenous calcitonin production rates. *Gynecol Endocrinol* 6 (1): 65-71., 1992.
145. Reitsma PH, Bijvoet OL, Frijlink WB, Vismans FJ, van Breukelen FJ. Pharmacology of disodium (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate. *Adv Exp Med Biol* 128: 219-27, 1980.
146. Rickard DJ, Gowen M, MacDonald BR. Proliferative responses to estradiol, IL-1 alpha and TGF beta by cells expressing alkaline phosphatase in human osteoblast-like cell cultures. *Calcif Tissue Int* 52 (3): 227-33., 1993.

147. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11 (3): 312-24, 1996.
148. Ringe JD. [Bisphosphonate therapy in corticoid-induced osteoporosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 122 (40): 1231., 1997.
149. Ringe JD. [Osteoporosis in men]. *Dtsch Med Wochenschr* 116 (42): 1612., 1991.
150. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37 (5): 453-60, 1985.
151. Rodan GA, Heath JK, Yoon K, Noda M, Rodan SB. Diversity of the osteoblastic phenotype. *Ciba Found Symp* 136: 78-91, 1988.
152. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1 (2): 85-98, 1991.
153. Rodan GA, Seedor JG, Balena R. Preclinical pharmacology of alendronate. *Osteoporos Int* 3 (Suppl 3): S7-12., 1993.
154. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 47 (18): 4961-6, 1987.
155. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 24 (5 Suppl): 73S-79S., 1999.
156. Rogers MJ, Ji X, Russell RG, Blackburn GM, Williamson MP, Bayless AV, Ebetino FH, Watts DJ. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 303 (Pt 1): 303-11., 1994.

157. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR. Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 89 (1): 46-52, 1992.
158. Rowe PS. The molecular background to hypophosphataemic rickets. *Arch Dis Child* 83 (3): 192-4., 2000.
159. Russell RG, Bisaz S, Fleisch H, Currey HL, Rubinstein HM, Dietz AA, Boussina I, Micheli A, Fallet G. Inorganic pyrophosphate in plasma, urine, and synovial fluid of patients with pyrophosphate arthropathy (chondrocalcinosis or pseudogout). *Lancet* 2 (7679): 899-902., 1970.
160. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner* 27 (1): 57-67., 1994.
161. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88 (6): 2095-105., 1991.
162. Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M, Ludwig H, Leuenberger P, Burckhardt P, Thiebaud D. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 18 (2): 133-9., 1996.
163. Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 38 (6): 342-9., 1986.
164. Schenk R, Merz WA, Muhlbauer R, Russell RG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 11 (3): 196-214., 1973.

165. Schnitzer T, Bone HG, Crepaldi G, Adami S, McClung M, Kiel D, Felsenberg D, Recker RR, Tonino RP, Roux C, Pinchera A, Foldes AJ, Greenspan SL, Levine MA, Emkey R, Santora AC, 2nd, Kaur A, Thompson DE, Yates J, Orloff JJ. Therapeutic equivalence of alendronate 70 mg once-weekly and alendronate 10 mg daily in the treatment of osteoporosis. Alendronate Once-Weekly Study Group. *Aging (Milano)* 12 (1): 1-12., 2000.
166. Schulz A, Osteoporose, Pathogenese, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten Kap.1.4: Aufbau und Funktion des Skelettes. Walter de Gruyter -Verlag in Berlin; New York, S 64-86, 1991.
167. Schulz A, „True bone“ in vitro? *Virchows Arch.*; 426(2):103-5, 1995.
168. Schweitzer DH, Oostendorp-van de Ruit M, Van der Pluijm G, Lowik CW, Papapoulos SE. Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 10 (6): 956-62., 1995.
169. Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P. Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 35 (1): 87-99, 1983.
170. Sietsema WK, Ebetino FH, Salvagno AM, Bevan JA. Antiresorptive dose-response relationships across three generations of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 15 (9): 389-96, 1989.
171. Siris E, Weinstein RS, Altman R, Conte JM, Favus M, Lombardi A, Lyles K, McIlwain H, Murphy WA, Jr., Reda C, Rude R, Seton M, Tiegs R, Thompson D, Tucci JR, Yates AJ, Zimering M. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (3): 961-7., 1996.

172. Sloomweg MC, Ederveen AG, Schot LP, Schoonen WG, Kloosterboer HJ. Oestrogen and progestogen synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation. *J Endocrinol* 133 (2): R5-8., 1992.
173. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of human osteosarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs* 12 (5): 459-65., 2001.
174. Stracke H, Schulz A, Weber U, Ullmann J, Schatz H. [Osteocalcin and bone histology in osteoporosis]. *Klin Wochenschr* 65 (22): 1095-100., 1987.
175. Sutherland MK, Hui DU, Rao LG, Wylie JN, Murray TM. Immunohistochemical localization of the estrogen receptor in human osteoblastic SaOS-2 cells: association of receptor levels with alkaline phosphatase activity. *Bone* 18 (4): 361-9., 1996.
176. Tanzer ML. Cross-linking of collagen. *Science* 180 (86): 561-6., 1973.
177. Tsingotjidou AS, Zotalis G, Jackson KR, Sawyers C, Puzas JE, Hicks DG, Reiter R, Lieberman JR. Development of an animal model for prostate cancer cell metastasis to adult human bone. *Anticancer Res* 21 (2A): 971-8., 2001.
178. Urashima M, Chen BP, Chen S, Pinkus GS, Bronson RT, Dederda DA, Hoshi Y, Teoh G, Ogata A, Treon SP, Chauhan D, Anderson KC. The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow. *Blood* 90 (2): 754-65., 1997.
179. Uusitalo H, Hiltunen A, Ahonen M, Gao TJ, Lefebvre V, Harley V, Kahari VM, Vuorio E. Accelerated up-regulation of L-Sox5, Sox6, and Sox9 by BMP-2 gene transfer during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 16 (10): 1837-45., 2001.
180. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 31 (3): 197-293, 1994.

181. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 137 (6): 2324-33, 1996.
182. Watts NB, Becker P. Alendronate increases spine and hip bone mineral density in women with postmenopausal osteoporosis who failed to respond to intermittent cyclical etidronate. *Bone* 24 (1): 65-8, 1999.
183. Weinstein RS, Hutson MS. Decreased trabecular width and increased trabecular spacing contribute to bone loss with aging. *Bone* 8 (3): 137-42, 1987.
184. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 15 (4): 439-61., 1994.

8. Anhang

Wesentliche Teil dieser Arbeit waren Inhalt von Vorträgen und Posterpräsentationen:

A.Vassiliadou, W.Fassbender, B. Fohr, H. Stracke (1998)
"Effect of two bisphosphonates on a human osteoblastic cell line"
Bone Vol.22, No. 3, Supplement 45S-64S

A. Vassiliadou, A. Battmann, W. Fassbender, H. Stracke
"Effects of Etidronate, Alendronate and Ibandronate on Normal Human Osteoblasts
and SAOS Osteosarcoma Cells." (1998)
Bone Vol.23, No. 5, T472

A. Vassiliadou, H. Stracke, U. Stahl, W. J. Fassbender, A. Schulz,
A. Battmann (1999)
Bisphosphonates Have Direct Effects on Interleukin-6 Production by Cells of
the Osteoblastic Lineage: Evidence of Paracrine Inhibition of Osteoclastogenesis.
J. Bone Min Res. 14, S 1: SA 139

A. Vassiliadou, J. Rose, A. Schulz, A. Battmann (2000)
Influence of Bisphosphonates on the collagen (CICP) Production in human
osteoblastic cells.
Bone Vol.26, No. 3, Supplement B21

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. A. Schulz, dem Leiter des Institutes für Pathologie möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für seine wissenschaftliche und menschliche Unterstützung sowie die Bereitstellung seiner Laboreinrichtungen. Ohne ihn und ohne die hervorragende Betreuung von Dr. med. A. Battmann wäre dieses Projekt nicht zustande gekommen.

Des weiteren möchte ich Dr. med. B. Fohr für die ausführliche Einweisung in die Geheimnisse der Zellkultur sowie die Anregungen bezüglich der Zielsetzung herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. R. G. Bretzel und Prof. Dr. med. H. Stracke gilt mein Dank für die Einführung in die osteologische Endokrinologie.

Mein besonderer Dank gilt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der durch sein Stipendium meinen Aufenthalt in Gießen und damit das Projekt finanziell unterstützt hat.

Lebenslauf

Athina Vassiliadou, Pommerotter 14, 52076 Aachen

<i>Geburtsdatum und Geburtsort</i>	20. 01. 1969 Athen
Schulbildung	1974-1980: Grundschule Athen 1980-1986: Gymnasium: Deutsche Schule Athen Juni 1986: Griechisches und deutsches Abitur
Studium	1987-1988: Studium der Zahnmedizin, Thessaloniki 1988-1994: Medizinstudium an der Aristotelischen Universität Thessaloniki Famulatur in der allgemeinchirurgischen Abteilung der Universität Tübingen Praktisches Jahr: Innere Medizin in der III. Med. Klinik und Poliklinik der JLU-Gießen als ERASMUS Stipendiatin 10/94; 11/94: Abschluß des Medizinstudiums / Approbation
Beruflicher Werdegang	1/95 -9/96: Kreiskrankenhaus der griechischen Insel Ikaria -stationäre und ambulante Versorgung von internistischen, chirurgischen und pädiatrischen Patienten, Not- und Aufnahmedienste 10/96-8/98: Stipendiatin vom Deutschen Akademischen Austauschdienst Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der JLU-Gießen -Schwerpunkt Endokrinologie, Gastroenterologie- 8/98- 5/99: Wissenschaftliche Assistentin im Institut für Pathologie der JLU (Arbeitsgruppe Osteologie) Dissertation: „Humane Osteoblasten und Bisphosphonate. Eine in vitro Studie des Verhaltens von humanen Osteoblasten unter dem Einfluss von Bisphosphonaten verschiedener Generationen“ seit 5/99: Assistenzärztin in der II. Med.Klinik, RWTH-Aachen -Schwerpunkt Nephrologie und klinische Immunologie-