

Aus der orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim  
Frankfurt am Main

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Einfluss von Ibandronat auf die  
Knochenmineraldichte und Osteointegration  
bei Hydroxylapatit beschichteten Implantaten  
im Femur osteoporotischer Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
MARTINA STEINACKER

Gießen 2005







Aus der orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim Frankfurt am Main

Betreuer: PD Dr. A. Kurth

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

**Einfluss von Ibandronat auf die  
Knochenmineraldichte und Osteointegration  
bei Hydroxylapatit beschichteten Implantaten  
im Femur osteoporotischer Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
MARTINA STEINACKER  
Tierärztin aus Frankfurt am Main (Hessen)

Gießen 2005



Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

---

1. Berichterstatter:

PD Dr. A. Kurth

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

Tag der mündlichen Prüfung:

17.08.2005



Diese Arbeit möchte ich in großer Dankbarkeit  
meinen lieben Eltern widmen,  
die mich in all den Jahren mit unendlicher Geduld  
unterstützt haben.



**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Der Knochen</b> .....	<b>3</b>
2.1.1.	Knochenmorphologie .....	3
2.1.2.	Knochenhistologie .....	3
2.1.3.	Knochenarten .....	5
2.1.4.	Zusammensetzung der Knochengrundsubstanz .....	6
2.1.5.	Knochenzellen .....	7
2.1.6.	Knochenphysiologie .....	8
<b>2.2.</b>	<b>Osteoporose</b> .....	<b>10</b>
2.2.1.	Definition .....	10
2.2.2.	Klassifikation der Osteoporosen .....	10
2.2.3.	Ätiologie der verschiedenen Osteoporosen .....	11
2.2.4.	Qualitative und quantitative Einteilung der Osteoporosen .....	13
2.2.4.1.	Qualitative Einteilung .....	13
2.2.4.2.	Quantitative Einteilung .....	13
2.2.5.	Epidemiologie .....	14
2.2.6.	Pathophysiologie .....	14
2.2.7.	Klinisches Bild .....	15
2.2.8.	Diagnose .....	17
2.2.8.1.	Densitometrische Verfahren .....	17
2.2.9.	Prävention .....	18
2.2.10.	Therapie .....	19
<b>2.3.</b>	<b>Bisphosphonate</b> .....	<b>20</b>
2.3.1.	Struktur und Wirkung der Bisphosphonate .....	20
2.3.2.	Physikalisch-chemische und biologische Effekte .....	20

## Inhaltsverzeichnis

2.3.3. Relative Wirksamkeit von Bisphosphonaten .....	21
2.3.4. Wirkmechanismus .....	22
2.3.5. Pharmakokinetik.....	24
2.3.5.1. Bioverfügbarkeit.....	24
2.3.5.2. Verteilung.....	24
2.3.6. Das Bisphosphonat Ibandronat (BM 21. 0955).....	25
2.3.6.1. Pharmakodynamisches Profil.....	25
2.3.6.2. Pharmakokinetisches Profil.....	30
2.3.6.3. Nebenwirkungen .....	31
2.3.6.4. Therapeutischer Einsatz von Ibandronat bei Osteoporose .....	32
<b>2.4. Endoprothetik.....</b>	<b>34</b>
2.4.1. Einsatz von Endoprothesen .....	34
2.4.2. Primäre Stabilität.....	34
2.4.3. Sekundäre Stabilität / Osteointegration.....	34
2.4.4. Zementfreie Prothesen.....	35
2.4.5. Bioaktive Oberflächenbeschichtungen.....	36
2.4.6. Hydroxylapatit.....	36
2.4.7. Material .....	40
2.4.8. Verträglichkeit und Komplikationen.....	41
2.4.8.1. Infektion .....	42
2.4.8.2. Osteolyse .....	42
2.4.8.3. Osteopenie .....	43
2.4.8.4. Ermüdungsversagen .....	43
2.4.8.5. Implantatbewegung .....	44
2.4.8.6. Erhöhter Flüssigkeitsdruck.....	44
2.4.9. Einsatz von Bisphosphonaten in der Endoprothetik .....	44
<b>2.5. Tiermodelle in der Osteoporoseforschung.....</b>	<b>47</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>49</b>
3.1. Versuchstiere und Tierhaltung .....	49
3.2. Die Osteoporose .....	49

## Inhaltsverzeichnis

3.3. Die Implantate .....	50
3.4. Die Testsubstanz Ibandronat .....	51
3.5. Versuchsplan .....	51
3.5.1. DXA-Messung .....	51
3.5.2. Einteilung der experimentellen Gruppen .....	52
3.5.3. Der chirurgische Eingriff .....	53
3.5.4. Euthanasie .....	53
3.6. Untersuchungsmethoden .....	54
3.6.1. DXA-Analyse.....	54
3.6.2. Sektion.....	55
3.6.3. Röntgen .....	56
3.6.4. Präparation .....	56
3.6.5. Histologie .....	58
3.7. Statistik.....	60
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1. Tiere .....	61
4.2. Gewichtsveränderung.....	62
4.3. DXA-Analyse.....	62
4.4. Röntgenbildanalyse .....	64
4.5. Histologie .....	65
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>81</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>
9.1.	Tabellen.....	102
9.1.1.	Gewichtsveränderungen.....	102
9.1.2.	Unterschiede bezüglich der Knochenmineraldichte.....	103
9.1.2.1.	Sham.....	103
9.1.2.2.	OVX.....	104
9.1.2.3.	Ibandronat 1µg.....	105
9.1.2.4.	Ibandronat 25µg.....	106
9.1.3.	Unterschiede bezüglich der Knochenmenge in der Peripherie.....	107
9.1.4.	Unterschiede bezüglich der Osteointegration.....	108
9.2.	Abkürzungsverzeichnis.....	109

### 1 Einleitung

Die Osteoporose ist eine der großen Volkskrankheiten. Aufgrund ihrer Bedeutung wurde sie von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in die Reihe der 10 bedeutendsten Erkrankungen aufgenommen (Götte aus (60) S. 86-87). Sie wird definiert als systemische Skeletterkrankung, die durch einen Verlust an Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit daraus resultierender erhöhter Knochenbrüchigkeit und Neigung zu Frakturen gekennzeichnet ist (18, 130).

Beim Menschen entwickelt sich die Osteoporose in erster Linie durch die reduzierte Östrogenproduktion infolge der Menopause (Götte aus (60) S. 86-87). Tiere erkranken weitaus weniger häufig an Osteoporose, jedoch ist die Ätiologie mannigfaltiger. Speziell bei Weidevieh ist die Osteoporose verbreitet und üblicherweise alimentären Ursprungs (54).

Jede osteoporotische Fraktur bedeutet für den Betroffenen eine immense Einschränkung der Lebensqualität und Leistungsfähigkeit.

Praktisch alle Patienten mit einem Bruch des Oberschenkelhalses müssen primär operativ versorgt werden, was zumeist die Implantation eines künstlichen Hüftgelenkes zur Folge hat. Dabei hängt der Langzeiterfolg eines solchen Eingriffs bei zementfreien Implantaten sowohl von der primären Stabilität, die durch die Verankerung des Prothesenstiels im Knochen erreicht wird, als auch von der sekundären Stabilität ab (7). Die bioaktive Oberflächenbeschichtung mit Hydroxylapatit trägt zum Erreichen der Osteointegration bei, mit dem Ziel einer möglichst frühzeitigen postoperativen Mobilisierung der Patienten durch die direkte Lasteinleitung vom Implantat in den Knochen (86).

Bisphosphonate sind eine Klasse von Arzneimitteln mit spezifisch biologischer Wirkung am Knochen. Sie vermindern den Knochenumsatz durch Hemmung des Knochenabbaus. In einer Reihe von klinischen Studien wurde der Beweis geführt, dass mit Bisphosphonaten nicht nur ein Erhalt und eine Steigerung der Knochenmineraldichte, sondern vor allem auch eine signifikante Reduktion des Risikos für Hüftgelenkfrakturen und andere osteoporotische Frakturen möglich ist (47). In präklinischen Studien konnte unter Bisphosphonattherapie eine frühe Zunahme von neu gebildetem Knochen um Implantate, sowie eine Verbesserung des Knochen/Implantat Kontaktes nachgewiesen werden (74).

## Einleitung

Ibandronat ist ein Bisphosphonat der 3. Generation, dessen Eignung für den klinischen Einsatz bei Patienten, die an Osteoporose erkrankt sind und eine Endoprothese benötigen, in dieser Arbeit untersucht werden soll:

### Hypothese:

Eine simulierte Osteoporose verschlechtert die Osteointegration von Metallimplantaten und die Gabe von Ibandronat gleicht diesen Effekt aus und verbessert die Osteointegration dieser Implantate.

### Forschungsfragen:

- a) Verschlechtert eine simulierte Osteoporose durch OVX bei Ratten die Osteointegration von HA beschichteten Implantaten?
- b) Welchen Einfluss hat die Gabe von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat auf die Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule in Ratten mit einer simulierten Osteoporose?
- c) Welchen Einfluss hat die Gabe von  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat auf die Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule in Ratten mit einer simulierten Osteoporose?
- d) Kann die Gabe von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat die Osteointegration von HA Implantaten in Ratten mit einer simulierten Osteoporose verbessern?
- e) Kann die Gabe von  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat die Osteointegration von HA Implantaten in Ratten mit einer simulierten Osteoporose gegenüber der Kontrollgruppe und der mit  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat behandelten Gruppe verbessern?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1. Der Knochen

#### 2.1.1. Knochenmorphologie

Nach der äußeren Form unterscheiden wir lange, kurze und platte Knochen.

Lange Knochen oder Röhrenknochen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, gliedern sich in ein röhrenförmiges Mittelstück, die Diaphyse, die beiden Endstücke, die Epiphysen und die Metaphysen, die sich zwischen Diaphyse und Epiphysen befinden (55).

#### 2.1.2. Knochenhistologie

Jeder Knochen besteht aus der äußeren Substantia compacta (kortikaler Knochen) und der inneren Substantia spongiosa (trabekulärer Knochen) (Abb. 1).

Funktioneller Grundbaustein der Kompakta ist das Osteon bzw. Havers-System, ein ca. 250µm mal 1-5cm großes, zylindrisches Gebilde. Es besteht aus 2-3µm dicken, konzentrisch geschichteten Knochenlamellen (Havers-Lamellen) um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal). Die Havers-Kanäle beherbergen die das Knochengewebe versorgenden Blutgefäße und Nerven. Über ihre seitlichen Verzweigungen, die Volkmann-Kanäle, ziehen die Blutgefäße von einem Osteon zum anderen (85). Im Gegensatz zur dicht gepackten Kompakta stellt sich die Spongiosa als kompliziertes Schwammwerk eines Bälkchen- und Platten-systems dar, in dessen Zwischenräumen das Knochenmark lokalisiert ist (85).

# Literaturübersicht

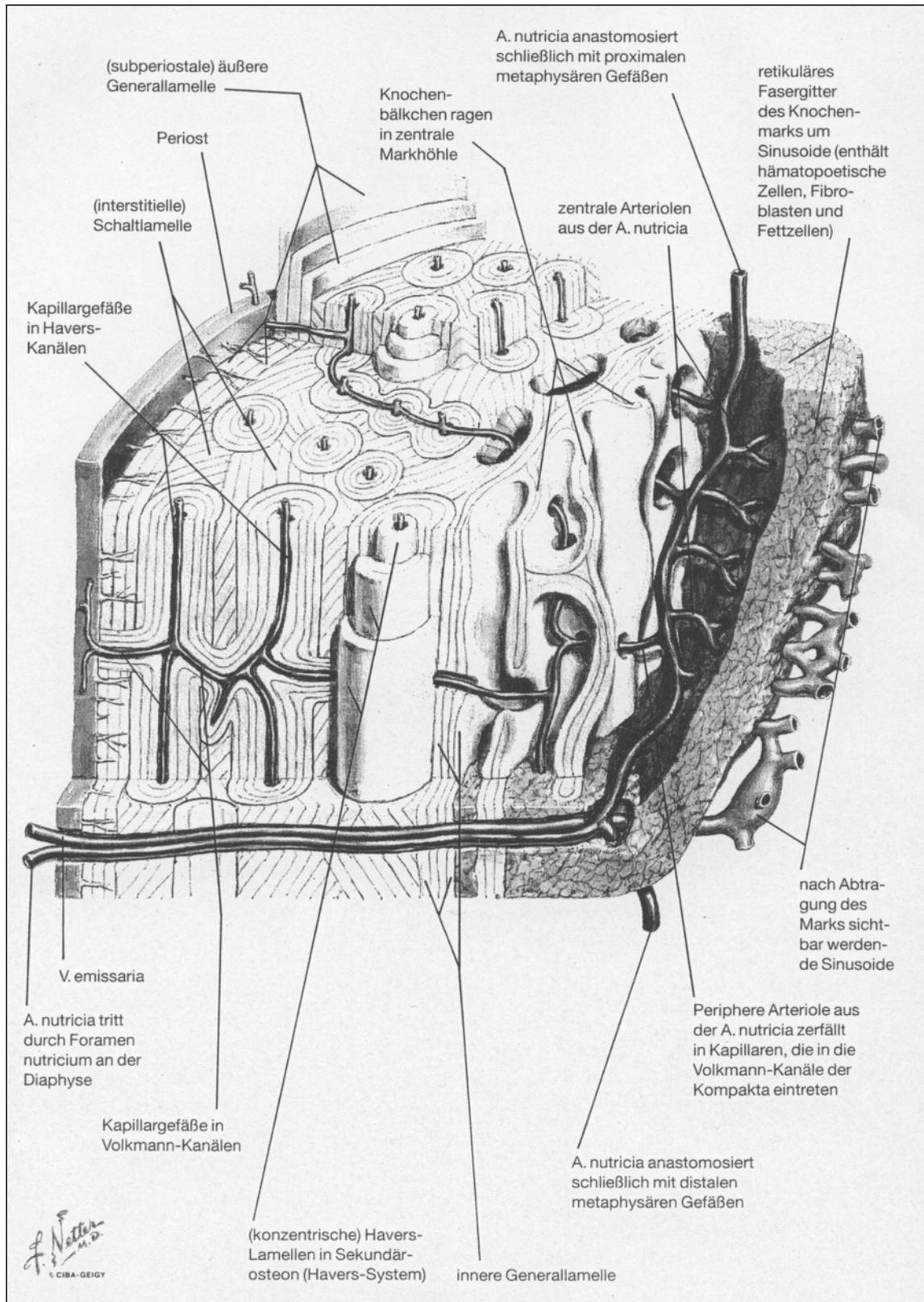


Abb. 1: Aufbau der Kompakta (Kortikalis) (85)

### 2.1.3. Knochenarten

Histologisch lassen sich weiterhin 2 Arten von Knochengewebe unterscheiden: Geflecht- oder Faserknochen und Lamellenknochen.

Charakteristisch für den Geflechtknochen ist, dass die Kollagenfaserbündel in der Grundsubstanz einen unregelmäßigen Verlauf haben. Zudem gibt es einen größeren Zellreichtum, eine größere Anzahl und ungeordnetere Verteilung der Osteozyten, eine kürzere Lebenserwartung und einen geringeren Anteil an anorganischen Bestandteilen als im Lamellenknochen. Eine Wachstumsorientierung erfolgt entlang von Kapillaren und nicht entlang mechanischer Kraftlinien wie beim Lamellenknochen. Der Geflechtknochen dient dem schnellen Aufbau mineralisierter Matrix und wird im Vergleich zu lamellärem Knochen als unreifer Knochen eingestuft. Geflechtknochen tritt bei jeder Neubildung von Knochen auf, sei es während der Entwicklung oder bei der Knochenbruchheilung und wird durch Lamellenknochen ersetzt (55).

Ausdifferenzierter Knochen ist histologisch Lamellenknochen, der durch Umbauvorgänge aus Geflechtknochen entsteht. Er ist gekennzeichnet durch Lamellen und Knochenkanälchen. Lamellen sind deutlich voneinander abgesetzte Knochenschichten, deren Dicke durchschnittlich 3-7µm beträgt. Charakterisiert werden die Lamellen durch Kollagenfasern und Osteozyten. Die Kollagenfasern haben in jeder Lamelle einen typischen, in der Regel schraubenförmigen Verlauf, deren Verlaufsrichtung und Steigungswinkel von Lamelle zu Lamelle wechseln. Innerhalb einer Lamelle verlaufen die kollagenen Fibrillen jedoch parallel zueinander (16). Dieses Bauprinzip ermöglicht die Anpassung des Knochens an Zug- und Druckbelastungen. Die Osteozyten liegen an der Grenze zwischen zwei Lamellen. Sie befinden sich in Knochenhöhlen (Lacuna ossea), von denen radiär Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) für die Osteozytenfortsätze ausgehen. Die Canaliculi kommunizieren mit benachbarten Osteonen und bekommen schließlich Anschluss an den Havers-Kanal. Die Osteozyten füllen die Knochenhöhlen nie vollständig aus, da der verbleibende Raum zwischen Plasmalemma und Knochenmatrix dem Substanztransport und somit der Ernährung der Knochenzellen dient (65).

## Literaturübersicht

Lamellen sind sehr unterschiedlich angeordnet. Besonders regelmäßig ist ihre Anordnung jedoch in der Kompakta der Diaphysen von Röhrenknochen.

Die kleinste strukturelle Einheit des Lamellenknochens ist das Osteon bzw. Havers-System, in dessen Mitte ein Zentralkanal (Havers-Kanal) mit Blutgefäß (Havers-Gefäß), Bindegewebe und vegetativen Nerven verläuft. Die Osteone sind aus konzentrisch gelagerten Knochenlamellen (Speziallamellen) aufgebaut, deren Anzahl zwischen 3 und 20 liegen kann. Die Abgrenzung zwischen den Osteonen erfolgt durch eine Kittsubstanz (Linea cementalis), welche die äußere Lamelle umgibt. Zwischen den Osteonen liegen Schaltlamellen. Hierbei handelt es sich um Bruchstücke von älteren, teilweise abgebauten Lamellensystemen. Der äußere, unmittelbar an das Periost anschließende Bereich der Kompakta wird von Lamellen gebildet, die größtenteils kontinuierlich den gesamten Querschnitt umfassen. Man bezeichnet sie als äußere Generallamellen. Die inneren Generallamellen, die sich an der inneren, an die Markhöhle grenzenden Oberfläche befinden, sind hingegen nur mäßig entwickelt und setzen sich in Spongiosabälkchen fort.

### 2.1.4. Zusammensetzung der Knochengrundsubstanz

Die Interzellulärsubstanz des Knochens wird auch als Knochengrundsubstanz bezeichnet (55). Sie setzt sich aus ca. 65% anorganischen und ca. 35% organischen Bestandteilen zusammen. Die anorganischen Bestandteile machen etwa zwei Drittel des Gesamttrockengewichtes des Knochens aus. Zu den anorganischen Knochenmineralien zählen vor allem das Calciumphosphatkristall Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) und Calciumkarbonat. Diese Kristalle haben die Form von Nadeln, Platten und Stäbchen und sind in die organische Knochengrundsubstanz eingelagert. Andere anorganische Bestandteile sind die Elemente H, O, Mg, K, Cl, Fe und Na, um nur einige zu nennen.

Die organische Knochenmatrix setzt sich zu etwa 90% aus Kollagen und zu etwa 10% aus nicht-kollagenen Proteinen wie z.B. Osteocalcin, Osteonektin, Proteoglykanen, Albuminen u.a. Lipiden zusammen (31).

### 2.1.5. Knochenzellen

Man unterscheidet 4 verschiedene Formen von Knochenzellen:

Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Vorläuferzellen sind mesenchymaler Herkunft und liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche, sowie in den Havers-Kanälen. Histologisch sind sie relativ undifferenziert. Sie sind spindelförmig, haben nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen spärlich entwickelten Golgi-Komplex. Bei Stimulation wandeln sich die besonders proliferationsfreudigen Vorläuferzellen jedoch in Osteoblasten mit deutlich ausgeprägtem Syntheseapparat um (55).

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab und sind für die Synthese der organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz verantwortlich. Sie bilden an der Oberfläche von Knochenbälkchen eine epithelähnliche Struktur und sezernieren dort neue, noch nicht verkalkte Grundsubstanz (Osteoid). Während der Bildung von Grundsubstanz und der Überwachung ihrer Mineralisierung, setzen die Osteoblasten in großen Mengen alkalische Phosphatase frei, wodurch die Grundsubstanz auf die Mineralisierung vorbereitet wird. Das Osteoid wird im trabekulären Knochen nach 25 Tagen und im kortikalen Knochen nach 35 Tagen mineralisiert (31). In der Synthesephase sind Osteoblasten kubisch bis hochprismatisch, verfügen über ein gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum, einen deutlichen Golgi-Apparat und lichtmikroskopisch stellen sie sich basophil dar. Ihre Aktivität wird vor allem durch Hormone gesteuert. Ruhende Osteoblasten an der Knochenoberfläche sind flach und werden als endostale Belegzellen („lining cells“) bezeichnet (55).

Sobald Osteoblasten in von ihnen produziertem mineralisiertem Osteoid eingemauert werden, verändern sie ihren Phänotyp und sind als Osteozyten zu bezeichnen. Es sind ovale Zellen, die in kleinen Höhlen (Lakunen) in den Lamellen lokalisiert sind. An ihrer Oberfläche tragen sie zahlreiche Fortsätze, die die Lakunen über ein Netz von Kanälen bzw. Kanälchen (Canaliculi) verlassen und mit den Fortsätzen anderer Osteozyten in Kontakt treten. Elektronenmikroskopisch sind zwischen den Fortsätzen Verbindungen, sogenannte „gap junctions“, erkennbar, die wesentlich zu den Austauschvorgängen zwischen Blutgefäßen, Interzellularflüssigkeit und Osteozyten beitragen (85).

## Literaturübersicht

Osteoklasten entwickeln sich im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen aus der hämatopoetischen Stammzelllinie, genauer gesagt aus der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildenden Einheit (GM-KBE) (31). Es sind vielkernige Riesenzellen, deren Aufgabe es ist, mineralisierte Knochengrundsubstanz abzubauen. Spezifische Hormone und Wachstumsfaktoren, wie das Parathormon, Vitamin D<sub>3</sub>, Macrophage Colony stimulating Factor (M-CSF) und Interleukin 1  $\alpha$  und  $\beta$  beeinflussen die Stammzelle, sich in eine Osteoklastenvorläuferzelle zu entwickeln. Nach der Stimulation proliferiert die Vorläuferzelle, fusioniert und formt so den vielkernigen Osteoklasten. Mit einem Durchmesser von 100 $\mu$ m erreichen Osteoklasten eine erhebliche Größe und ihr azidophiler Zelleib enthält bis zu 100 Kerne und ist lysosomen- und mitochondrienreich (121). Sie befinden sich auf der Oberfläche von kortikalem oder trabekulärem Knochen, häufig in Vertiefungen, den Howship-Lakunen, oder im kortikalen Knochen selbst, wo sie die Gefäßkanäle bohren, in denen die neuen Osteone gebildet werden. Ein aktiver Osteoklast besitzt dafür an seiner der Knochengrundsubstanz zugewandten Oberfläche eine als Bürstensaum (ruffled border) bezeichnete, spezialisierte Zellmembran, die durch dauernde Bewegung die Zelloberfläche und die aktiv resorbierenden Abschnitte des Osteoklasten vergrößert. Über diese Zellmembran werden zunächst H<sup>+</sup>-Ionen mit Hilfe einer Protonen-ATPase aus dem Inneren der Zelle transportiert, die das Knochenmineral auflösen und im zweiten Schritt proteolytische Enzyme, um die übrig gebliebene organische Matrix abzubauen. Beim Aufbau oder Umbau eines Osteons bohrt sich ein Osteoklast täglich 30 bis 100 $\mu$ m in der Knochenmatrix voran. Er vermag pro Zeiteinheit die gleiche Knochenmenge abzubauen, die von 100 – 150 Osteoblasten aufgebaut wurden (55).

### 2.1.6. Knochenphysiologie

Die wichtigsten Aufgaben des Knochengewebes sind:

- a) Stütz-, Struktur-, Architektur- und Mobilitätsfunktion
- b) Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase

## Literaturübersicht

Diese Hauptfunktionen werden durch lebenslang ablaufende Formations- und Resorptionsvorgänge gewährleistet.

Begriffe wie Wachstum, Modeling und Remodeling sind hierbei abzugrenzen.

Unter Wachstum im engeren Sinne werden die Vorgänge verstanden, die sich in den Epiphysenfugen abspielen und zum Längenwachstum und somit zur Nettozunahme der Knochenmasse führen (55).

Modeling beschreibt eine Verstärkung der knöchernen Strukturen als Anpassungsmechanismus an mechanische Erfordernisse mit entsprechenden Formveränderungen der betroffenen Knochenteile. Die Fähigkeit zum Modeling ist während des Wachstums am größten und lässt mit zunehmendem Lebensalter nach, sodass die An- und Umbauaktivitäten des adulten Knochens zu 95% aus Remodeling und nur zu 5% aus Modeling bestehen (31).

Der Begriff Remodeling bezeichnet die lebenslang ablaufenden, dynamischen Umbauprozesse des Skeletts, bei denen es zu keiner Veränderung des ausgetauschten Knochen Volumens kommt. Im Gegensatz zu den beim Modeling verursachten Umbauvorgängen, bei denen Anpassungsvorgänge an mechanische Belastungen im Vordergrund stehen, zielt Remodeling überwiegend auf die Reparatur von Mikrofrakturen als Ermüdungsphänomen ab. Dabei wird Knochen an den Stellen angebaut, wo zuvor eine Resorption stattgefunden hat. Diese Verknüpfung wird als „coupling“ bezeichnet.

Die dynamische morphologische Struktur dieses lokalen Knochenumbaus ist die „basic multicellular unit“ (BMU), die auch als „bone remodeling unit“ (BRU) bezeichnet wird (31).

### 2.2. Osteoporose

#### 2.2.1. Definition

Auf der Konsensuskonferenz des 4. Internationalen Osteoporosekongresses 1993 in Hongkong wurde die Osteoporose definiert als systemische Skeletterkrankung, die durch einen Verlust an Knochenmasse und eine Störung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit daraus resultierender erhöhter Knochenbrüchigkeit und erhöhtem Frakturrisiko gekennzeichnet ist (18).

Eine allgemein vereinbarte Definition der Osteoporose existiert bisher nur für postmenopausale Frauen. Derzeit gilt noch die 1994 von einem WHO-Expertenkomitee formulierte Definition (130), dass eine Osteoporose dann vorliegt, wenn die mit DXA gemessene Knochendichte im Bereich der LWS niedriger als  $-2,5$  SD unter dem Mittelwert eines jungen, gesunden Normkollektivs liegt. Klinisch manifest ist eine Osteoporose dann, wenn durch inadäquates Trauma eine Fraktur eintritt.

Aufgrund der schnell fortschreitenden Technologie auf dem Gebiet der Knochenmassenmessung wurde offensichtlich, dass die von der WHO formulierte Definition nicht gleichermaßen für alle Messstellen, die mit DXA zugänglich sind und andere Techniken, wie bspw. Ultraschall, Anwendung finden kann. Selbst Messungen, die bei einer Person an zentralen und peripheren Stellen, ja sogar innerhalb zentraler Stellen (Wirbelsäule versus Hüfte) durchgeführt werden, können unterschiedliche Ergebnisse liefern (27). Kanis und Glüer (57) weisen daher darauf hin, dass die von der WHO formulierte Definition der Osteoporose DXA-Messungen im gesamten Hüftbereich vorbehalten bleibt.

#### 2.2.2. Klassifikation der Osteoporosen

Grundsätzlich können generalisierte und lokalisierte Osteoporosen unterschieden werden (93, 54, 21, 24). Eine generalisierte Osteoporose kann derzeit unbekannte oder teilweise unbekannte Ursachen haben und wird dann als primäre oder idiopathische Osteoporose bezeichnet. Hierzu zählen die:

## Literaturübersicht

Mensch	Tier
Postmenopausale Osteoporose (Typ I) Senile Osteoporose (Typ II) Idiopathische juvenile Osteoporose Idiopathische Osteoporose junger Frauen Idiopathische Osteoporose des Mannes	Kastrationsosteoporose Senile Osteoporose Juvenile Osteoporose bzw. Osteogenesis imperfecta

Hat die generalisierte Osteoporose jedoch bekannte oder weitgehend bekannte Ursachen, so spricht man von einer sekundären Osteoporose. Hierzu zählen die:

Mensch	Tier
Osteoporose bei endokrinen Störungen Osteoporose bei iatrogenen Ursachen Osteoporose bei entzündlichen Systemerkrankungen Osteoporose bei Immobilisation Osteogenesis imperfecta	Osteoporose bei endokrinen Störungen Osteoporose bei Hunger Osteoporose bei Mangelzuständen Osteoporose bei Immobilisation Osteoporose bei Darmparasiten

Die Aufzählung der lokalisierten Osteoporosen dient nur der Vollständigkeit, da ihr klinisches Auftreten irrelevant ist. Zu den lokalisierten Osteoporosen gehören die:

Mensch	Tier
Lokalisierte Inaktivitätsosteoporose Morbus Sudeck Gelenknahe Osteoporose bei rheum. Arthritis Lokalisierte Osteoporose bei Vaskulitiden Radiogene Knochendemineralisation Transistorische Osteoporose	Lokalisierte Inaktivitätsosteoporose Druckosteoporose Zirkulatorisch bedingte Osteoporose Trophoneurotische Osteoporose

### 2.2.3. Ätiologie der verschiedenen Osteoporosen

Beim Menschen sind nahezu alle klinisch relevanten Osteoporosen vom Typ I und II. Bei Tieren – insbesondere bei Hund und Katze – kommen diese Formen zwar auch vor, sind aber wesentlich seltener und klinisch relativ symptomlos (35, 54). Während die Ursache für die Osteoporose bei postmenopausalen Frauen auf die reduzierte Östrogenproduktion zurückzuführen ist, wodurch die protektive Wirkung dieser Hormone auf den Knochen verloren geht

## Literaturübersicht

(Götte aus (60) S. 86-90), ist die senile Osteoporose durch altersbedingte Bewegungsinaktivität, einen Ausfall der anabol wirkenden Sexualhormone, einen zu geringen Calciumgehalt in der Nahrung, einen Vitamin-D-Mangel oder eine anormale Hormonsekretion der Nebenschilddrüse begründet (35, 54, 12). Eine Osteoporose vom Typ I tritt bei Frauen nach der Menopause auf und betrifft vorwiegend den spongiösen Knochen. Je nachdem, ob der Eintritt in die Menopause weniger oder mehr als 10 Jahre zurückliegt, erfolgt eine Differenzierung in früh- und spätmenopausal. Bei der spätmenopausalen Osteoporose ist der Übergang in die senile Form fließend. Eine Osteoporose vom Typ II tritt nach dem 70. Lebensjahr auf und betrifft sowohl den spongiösen als auch den kortikalen Knochen (93).

Eine angeborene, qualitative Störung der Matrixsynthese liegt der erblichen Osteogenesis imperfecta zugrunde. Sie geht nicht nur mit einer quantitativ verminderten Osteogenese, sondern auch mit einer verminderten Matrixbildung infolge Osteoblasteninsuffizienz einher. Die Osteogenesis imperfecta entspricht einer juvenilen Osteoporose und kommt bevorzugt bei Bedlington-Terriern, Pudeln, Collies und Shelties vor, ist allgemein aber relativ selten (35, 119, 23, 110).

Erworbene Osteoporosen kommen sowohl bei jungen als auch bei erwachsenen Tieren vor. Unter den generalisierten Osteoporosen spielen die ernährungsbedingten Formen dabei die größte Rolle und betreffen insbesondere Rinder, aber auch Schafe, Ziegen und Schweine. Ursächlich sind ein kataboler Eiweißstoffwechsel bei exogenen oder endogenen Hungerzuständen, Malabsorptionssyndrome bei Enteritis oder intestinaler Parasitose, sowie Calcium-, Phosphor- oder Kupfermangel (54, 53, 96). Aber auch endokrine Störungen wie Hyperkortizismus (21, 53) und Inaktivität bei langem Festliegen (54) bedingen generalisierte Osteoporosen. Beim Mensch kann auch eine Störung der Calciumhomöostase eine Veränderung im Knochenstoffwechsel bewirken. Etwa 1,5kg Calcium sind beim Mann und etwa 1kg bei der Frau in Form von Hydroxylapatit im Knochen fixiert. Während des Knochenauf- und umbaus wird das Calcium von der Nahrung über das Blut in den Knochen eingebaut und die bereits eingelagerten Calciummengen werden daran gehindert, in die Blutbahn einzuströmen. Diese Steuerung erfolgt durch die Hormone der Calciumhomöostase: Parathormon, Vitamin D und Calcitonin. Mittelbar eingeschaltet sind dabei auch Glukokortikoide, sowie das Wachstumshormon mit den Wachstumsfaktoren und die Schilddrüsenhormone. Störungen der Bildung dieser Hormone erzeugen somit Störungen des Knochenstoffwechsels und können so zur Ursache einer sekundären Osteoporose werden (77).

## Literaturübersicht

Weitere Osteoporose bedingende Risikofaktoren beim Menschen sind Malabsorption, Hyperparathyreoidismus, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, renale Erkrankungen (Götte aus (60) S. 90), sowie ein ungenügender Knochenaufbau in der Adoleszenz (73).

### 2.2.4. Qualitative und quantitative Einteilung der Osteoporosen

#### 2.2.4.1. Qualitative Einteilung

Nach metabolischen Charakteristika ist zwischen einer High-turnover-Osteoporose und einer Low-turnover-Osteoporose zu unterscheiden.

Eine High-turnover-Osteoporose ist charakterisiert durch einen Knochenmassenverlust mit gesteigertem Knochenumbau. Es gibt eine anwachsende Zahl und Tiefe von Osteoklastenresorptionsplätzen, wobei die normalen Osteoblastenbemühungen nicht ausreichen, den Defekt zu reparieren.

Eine Low-turnover-Osteoporose ist charakterisiert durch einen Knochenmassenverlust mit reduziertem Umbau. Es liegt eine normale oder abnehmende Osteoklastenresorption vor, aber die Osteoblasten sind inaktiver als gewöhnlich (93, 53).

#### 2.2.4.2. Quantitative Einteilung

Die quantitative Einteilung (=densitometrische Klassifikation) der Osteoporose richtet sich nach den Maßstäben der WHO, wonach die Messwerte der Knochenmineraldichte als Kriterium dienen:

Physiologische Osteopenie	-1 SD
Osteopenie (Kontrollbereich/präklinische Osteoporose)	-1 bis -2,5 SD
Manifeste Osteoporose	<-2,5 SD
Osteoporose mit Fraktur	

Die gemessene Knochenmineraldichte wird als T-Wert (T-Score) angegeben. Der T-Wert bezieht sich auf die Spitzenknochenmasse junger, gesunder Erwachsener und zeigt die individuellen Patientenergebnisse als Abweichung von der Spitzenknochenmasse dividiert durch die Standardabweichung (SD) dieses Mittelwertes. Der Wert wird als Einheit in

Standardabweichungen angegeben. Dabei kann eine Beurteilung des Skelettstatus im Vergleich zu den altersentsprechenden Normdaten (Z-Score) vorgenommen werden. Diese Werte wurden für Frauen aufgestellt, finden jedoch bis zum Vorliegen konklusiver Daten auch bei Männern Anwendung (130).

### 2.2.5. Epidemiologie

Derzeit sind etwa 6 Millionen Menschen in Deutschland an Osteoporose erkrankt. 85% von ihnen sind weiblichen Geschlechts. Plakativ kann behauptet werden, dass jede 3. Frau und jeder 5. Mann an Osteoporose erkranken. Die jährliche Inzidenzzunahme von Wirbelkörperfrakturen bei Menschen über 70 Jahre beträgt 21%. Es wird geschätzt, dass fast jede zweite Frau, die das 50. Lebensjahr erreicht hat, in ihrem weiteren Leben eine osteoporotische Fraktur erleidet und 50% der Frauen über 80 Jahre bereits eine Wirbelkörperfraktur erlitten hat (Götte aus (60) S. 86-87).

In Deutschland werden im Jahr ca. 150.000 Oberschenkelhalsfrakturen registriert und therapiert. Die Kosten bzw. Folgekosten der Osteoporose werden in erster Linie durch die Versorgung von Oberschenkelhals-, Wirbelkörper- und Unterarmfrakturen hervorgerufen und können mit ca. 5 Milliarden Euro veranschlagt werden (Götte aus (60) S. 88).

Wegen dieser medizinischen und sozioökonomischen Auswirkungen auf unsere Gesellschaft kommt der Entwicklung präventiver und kurativer Behandlungsstrategien in Zukunft eine entscheidende Bedeutung zu.

Weitaus weniger häufig als der Mensch erkranken Tiere an Osteoporose (53). Dennoch ist die Skeletterkrankung speziell unter Weidevieh verbreitet. Allerdings wird sie leicht übersehen, es sei denn Lahmheiten oder Frakturen häufen sich (54). Aber auch Hunde, Katzen, Pferde, Schweine, Schafe und Ziegen sind betroffen (22, 72, 24, 35).

### 2.2.6. Pathophysiologie

Jeder Mensch entwickelt bis etwa zum 40. Lebensjahr seine maximal mögliche Knochenmasse (peak bone mass), die in Abhängigkeit vom Lebensalter einer durchschnittlichen Abnahme zwischen 1% und 3% pro Jahr unterliegt (Götte aus (60) S. 88).

## Literaturübersicht

Im Laufe des Lebens verlieren Frauen durchschnittlich 30-40% ihrer maximalen Knochenmasse und Männer etwa 20-30%. Von dieser Abnahme der Knochensubstanz sind sowohl Spongiosa als auch Kortikalis betroffen, wobei die Spongiosa vor allem in den frühen Stadien des Knochenverlustes stärker in Mitleidenschaft gezogen wird. Schätzungen zufolge entspricht dies einem Verlust von 50% spongiösem und 30% kortikalem Knochen. Nach Eintreten der Menopause werden die Trabekel dünner, weisen Lücken auf und können gelegentlich sogar ganz verschwinden, was eine veränderte Architektur zur Folge hat. Dabei bleiben die statisch und dynamisch wichtigsten Knochenbälkchen meist am längsten erhalten, was durch den gewissen Schutz erklärt wird, den sie durch den trophischen Reiz der besonderen Beanspruchung haben (96, 54, 22). Auch der kortikale Knochen wird dünner, was zu einer erhöhten Porosität führt. Der Mineralgehalt des Knochens bleibt im Gegensatz zur Osteomalazie jedoch unverändert (32).

Die Hauptursache der Osteoporose ist der kontinuierliche Knochenmassenverlust während des Lebens. Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das sich zeitlebens durch osteoklastären Abbau und osteoblastären Aufbau im Sinne von Resorption und Remodelling ständig erneuert. Bei Osteoporose verschiebt sich das ausgeglichene Verhältnis zugunsten des Knochenabbaus (77, 53).

Mit zunehmendem Alter lässt die Leistungsfähigkeit der Osteoblasten im Vergleich zu den Osteoklasten nach, sodass dieser dauernde Materialaustausch mit einer Minderung der Materialmenge verbunden ist. Diese negative Bilanz wird durch eine Steigerung der Knochenumbauvorgänge beschleunigt.

### 2.2.7. Klinisches Bild

Klinisch manifestiert sich die Osteoporose in Form ihrer Spätkomplikationen, den Frakturen und deren Folgen. Entsprechend vielfältig kann das klinische Bild der Krankheit sein. Der für die Osteoporose charakteristische Knochensubstanzverlust selbst bleibt nach heutiger Überzeugung ohne spezifische Klinik. Es ist jedoch vorstellbar, dass schon vor dem Auftreten frakturbedingter Beschwerden, Beeinträchtigungen im Rahmen von Mikrofrakturen auftreten (77, 54).

Die Lokalisation der Frakturen unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Alter, sodass bei postmenopausalen Frauen, als Folge eines Sturzes auf die ausgestreckte Hand der Unterarm am häufigsten betroffen ist, im Alter von etwa 65 Jahren meistens Wirbelkörperbrüche entste-

## Literaturübersicht

hen und bei der senilen Form sowohl bei Männern als auch bei Frauen Hüftfrakturen zunehmend im Vordergrund stehen. So hat eine 50 Jahre alte, weiße Frau ein Lebenszeitrisko von Frakturen des Unterarms, der Wirbelsäule oder der Hüfte von beinahe 40% (128). Einen Bruch des Oberschenkelhalses erlebt die überwiegende Mehrzahl der betroffenen Patienten als unmittelbar die Leistungsfähigkeit vernichtendes Ereignis. Praktisch alle Patienten müssen primär operativ versorgt werden, wobei im Sinne einer möglichst frühzeitigen postoperativen Mobilisierung, die Implantation einer Totalendoprothese anzustreben ist. Eine mittelbar verursachte Anhebung der Mortalität in den ersten 12 Monaten nach Oberschenkelhalsbrüchen und auch nach Wirbelkörperbrüchen ist gut dokumentiert (77).

Diese Osteoporose bedingten Frakturen wirken sich in vielerlei Hinsicht nachteilig auf die Gesundheit und Lebensqualität älterer Menschen aus. Dazu zählt der Verlust der Körpergröße, eine veränderte Haltung, dauerhafte Schmerzen durch Nervenkompressionen, eine Beeinträchtigung der physikalischen und funktionellen Fähigkeiten und nicht zuletzt beträchtliche emotionale Auswirkungen (128).

Bei den Tieren sind ebenfalls vorwiegend die Wirbelkörper, aber auch die flachen Knochen des Schädels, Skapula, Ilium und die langen Röhrenknochen betroffen. Anormale Zahnanlagen, Zahnung und Zahnstellungen werden ebenfalls beschrieben (54). Infolge der senilen Osteoporose treten vorwiegend Veränderungen am Schädel von Pferden und Hunden auf. Bei alten Hunden werden als Altersosteoporose vor allem die Veränderungen des Schädels beschrieben, die durch Atrophie und Zahnausfall der Kieferknochen, sowie Dickenabnahme der Knochen des Hirnschädels gekennzeichnet sind (22). Bei der Osteogenesis imperfecta zeigt das klinische Bild bewegungsunlustige Welpen, die zunächst nur die Hinter- oder Vorderextremitäten schonen und erst nach Erreichen des Lebensalters von ca. 4 Wochen in ihrer Entwicklung deutlich zurückbleiben (35). Bei der erworbenen juvenilen Osteoporose sind bei Welpen ab dem 2. Lebensmonat wechselnde, schmerzhafte, durch Frakturen bedingte Lahmheiten, Verbiegungen der Röhrenknochen und Verkrümmungen der Wirbelsäule zu beobachten (35, 23). Neben den Folgen der schweren, generalisierten Osteopenie wird das klinische Bild von Dentinmangel geprägt, wodurch spontane Zahnfrakturen auftreten (110). Erwachsene Tiere zeigen im Krankheitsfall ebenfalls Bewegungsstörungen infolge der Knochenschmerzen und spontane Frakturen bedingt durch geringste Traumen (54, 72).

### 2.2.8. Diagnose

Die Diagnose erfolgt zunächst einmal durch den Ausschluss von Krankheiten, die einen verminderten Mineralgehalt und damit eine vermehrte Strahlentransparenz im Röntgenbild aufweisen oder ähnliche Beschwerden wie Osteoporose hervorrufen. Dazu zählen bspw. maligne Erkrankungen oder andere Knochenstoffwechsel- und hereditäre Erkrankungen (93).

Zu Beginn steht die Anamnese mit der Erfassung von Risikofaktoren, Hinweisen auf sekundäre Osteoporose und differenzialdiagnostisch wichtige Erkrankungen. Auch Hinweise auf Schmerzen und beim Mensch der Verlust an Körpergröße sind wichtige Indizien (54). Zu den notwendigen Untersuchungen gehören die Inspektion, die Palpation, eine Funktionsprüfung, das Röntgen und die Knochendichtemessung. Röntgenologisch sind an den Knochen hauchdünne Korkstrukturen und mangelhafte Verkalkung zu erkennen. Infolge der verminderten Knochengewebsbildung und mangelhaften Festigkeit kommt es zu Röhrenknochenverbiegungen, metaphysären Fissuren und Grünholzfrakturen mit verminderter Kallusbildung. Die Wirbelsäule kann dorsoventral verkrümmt sein und Frakturen der Wirbelkörper und Rippen treten auf. Unter dem Druck der beiden Femurköpfe wird das Becken nach innen eingeeignet und die hauchdünnen Schädelknochen sind manuell leicht eindrückbar (35, 23). Schließlich runden Laboruntersuchungen die notwendigen Untersuchungen bei vorliegender Osteoporose ab, obgleich sie per se nicht in der Lage sind, diese Erkrankung zu diagnostizieren. Mit chemischen Messungen des Serumcalciums, des Serumphosphats und Markern des Knochenumbaus, wie bspw. der alkalischen Serumphosphatase, können lediglich Patienten erkannt werden, bei denen vermutlich ein gesteigerter Knochenmassenverlust und damit ein Osteoporoserisiko vorliegt (93, 69, 35).

#### 2.2.8.1. Densitometrische Verfahren

Bei der Diagnose und quantitativen Beurteilung der Osteoporose kommen den Verfahren zur Messung der Knochenmineraldichte zweifelsfrei die größte Bedeutung zu.

Bei den absorptiometrischen Methoden kann man zwischen Verfahren, die eine Flächenprojektion des Knochens auswerten und Verfahren, welche eine dreidimensionale Darstellung des Knochens nutzen, unterscheiden. Zu den Flächenprojektionsverfahren zählt man die Ein-Energie-Röntgen-Absorptiometrie (Single X-ray Absorptiometry, SXA) und die Zwei-Energie-Röntgen-Absorptiometrie (Dual X-ray Absorptiometry, DXA). Das Verfahren, wel-

ches eine dreidimensionale Darstellung benutzt, ist die Quantitative Computertomographie (Quantitative Computed Tomography, QCT), wobei für spezielle Anwendungen im peripheren Skelettbereich auch pQCT-Geräte (peripheral Quantitative Computed Tomography) zur Verfügung stehen.

Das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren ist die DXA-Messung. Über eine Detektion der den Knochen durchdringenden Strahlung wird auf die absorbierende Knochenmasse rückgeschlossen. Hierbei wird die Flächenmineraldichte berechnet und die Knochenmineraldichte (BMD) entsprechend in  $\text{g/cm}^2$  angegeben. Die Strahlendosis ist sehr gering und liegt zwischen  $1\text{-}3\mu\text{Sv}$ . Mit DXA können Messungen an Unterarm, Wirbelkörpern und Hüfte durchgeführt werden, möglichst zentral und peripher, da so die Aussagefähigkeit der Untersuchung verbessert wird. Die Absorption bei den beiden verwendeten Energien wird dazu genutzt, das Verhältnis von Knochen zu Weichteilgewebe zu bestimmen. Die Reproduktion von Knochendichtemessungen mit DXA schwankt je nach untersuchter Lokalisation zwischen 1 und 3%. Um Änderungen der Knochendichte nachweisen zu können, müssen diese wenigstens das 2,77fache der Reproduktion des Messgerätes betragen. Eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse ist jedoch nur bei Geräten desselben Herstellers möglich. Die Verwendung des T-Score ist nur für DXA-Verfahren wissenschaftlich fundiert (Augat aus (60) S. 68-72).

### 2.2.9. Prävention

Obwohl beim Mensch die klinische Manifestation der Osteoporose gewöhnlich erst später im Leben in Erscheinung tritt, ist es wichtig und möglich, das Risiko einer Erkrankung schon im Jugendalter durch die Vermeidung von gesundheitsschädigendem Verhalten, wie bspw. Rauchen, Alkohol- und Coca Cola-Konsum zu reduzieren (73).

Für Tier und Mensch gleichermaßen gilt, dass der Entstehung einer Osteoporose vorgebeugt werden kann, indem auf eine ausgewogene und ausreichende Nahrungsaufnahme geachtet wird, in der genügende Mengen Calcium enthalten sind. Während des Sommerhalbjahres müssen zudem ausreichende Vitamin D Speicher angelegt werden, da das während des Winterhalbjahres mit der Nahrung zugeführte Vitamin D in aller Regel nicht ausreicht.

Auch die Knochenkompression im Rahmen mechanischer Belastung ist ein entscheidender Motor der Knochenneubildung und des Knochenerhaltes. Daher trägt die unter heutigen Lebensbedingungen vergleichsweise bescheidene körperliche Belastung und Bewegung zur Osteoporoseentstehung bei (59, 54).

### 2.2.10. Therapie

Bei Menschen mit einer klinisch manifesten Osteoporose sollten eine Reihe nichtpharmakologischer Maßnahmen, wie bspw. gezielte Rehabilitationsmaßnahmen oder das Tragen einer Rückenorthese, Bestandteil einer Behandlung sein (77).

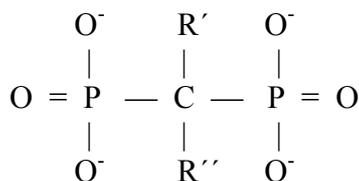
Darüber hinaus stehen inzwischen wirksame Pharmaka zur Verfügung. Ihr Ziel ist es jedoch nicht allein, den Knochenstoffwechsel zu beeinflussen, sondern im Einzelfall auch schmerzlindernd zu wirken. Neben den Bisphosphonaten (Grauer und Raue aus (60) S. 106-111) sind hierbei auch Östrogen-Ersatztherapien (128), die Gabe von Raloxifen (32, 77), die Zufuhr von Calcitonin, Calcium und Vitamin D (26) sowie der Einsatz von Fluorid und PTH (45, 19) zu nennen (77).

Je nach Ätiologie tragen eine normgerechte Eiweiß-, Fett-, Vitamin- und Mineralstoffversorgung sowie körperliche Aktivität ebenfalls zur Verbesserung des Krankheitsbildes bei (43, 58, 35).

## 2.3. Bisphosphonate

### 2.3.1. Struktur und Wirkung der Bisphosphonate

Bisphosphonate sind synthetische Substanzen und durch zwei C-P Bindungen charakterisiert. Wenn diese beiden Bindungen auf dem gleichen Kohlenstoffatom lokalisiert sind und so zu einer P-C-P Struktur führen, spricht man von geminalen Bisphosphonaten. Damit sind sie Analoga des Pyrophosphats, die statt eines Sauerstoffatoms ein Kohlenstoffatom enthalten. Die P-C-P Struktur ermöglicht zahlreiche Variationen, entweder durch Änderung der beiden Seitenketten am Kohlenstoffatom oder durch Veresterung der Phosphatgruppen. Die zahlreich entwickelten Bisphosphonate unterscheiden sich im Hinblick auf physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften. Auch hinsichtlich der Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Toxizität muss jede Substanz für sich betrachtet werden (36, 107).



Chemische Struktur eines geminalen Bisphosphonates

Unter bestimmten Indikationen finden bereits einige Verbindungen wie Alendronat, Clodronat, Etidronat, Ibandronat, Pamidronat, Risedronat, Tiludronat und Zoledronat in Deutschland als Medikamente Anwendung (32).

### 2.3.2. Physikalisch-chemische und biologische Effekte

Die physikalisch-chemischen Effekte der Bisphosphonate sind denen des Pyrophosphats recht ähnlich. Sie binden an die Calciumphosphat Kristalle der Mineralphase des Knochens und hemmen dadurch deren Bildung, Aggregation und Auflösung.

Der biologische Haupteffekt liegt in der Hemmung der Knochenresorption. Diese Hemmung erfolgt selbst dann, wenn die Resorption durch Parathormon, Vitamin D, Prostaglandine oder Produkte von Tumorzellen stimuliert wird. Die Resorptionsabnahme geht mit einer Erhöhung der Calciumbilanz und des Knochenmineralgehaltes einher. Ein Anstieg der Calciumabsorption im Darm wird durch eine Anhebung der Vitamin D Konzentration ermöglicht. Dieser Anstieg ist jedoch geringer, als aufgrund der starken Abnahme der Knochenresorption zu erwarten wäre. Das lässt sich mit dem Coupling zwischen Knochenneubildung und –resorption erklären, wobei nach einer gewissen Zeit auch die Knochenneubildung abnimmt. Der wichtigste Effekt der Bisphosphonate ist deshalb ein Rückgang des Knochenumbaus. Die Zunahme der Calciumbilanz und der damit verbundene Anstieg der Knochenmasse bilden die Grundlage für den Einsatz dieser Substanzen zur Osteoporoseprävention und –behandlung beim Menschen (103).

### 2.3.3. Relative Wirksamkeit von Bisphosphonaten

Die Wirksamkeit der verschiedenen Bisphosphonate auf die Knochenresorption variiert erheblich. Die resorptionshemmende Wirkung von Etidronat ist verhältnismäßig hoch und beträgt bei der Ratte über 1mg/kg parenteral pro Tag. Diese Dosis liegt sehr nahe an derjenigen, die auch die normale Mineralisation beeinträchtigt. Daher wurde gezielt nach Substanzen mit stärkerer antiresorptiver Wirkung geforscht, jedoch ohne die Mineralisation stärker zu hemmen. Dies gelang in den vergangenen Jahren durch die Entwicklung von Bisphosphonaten, die sich von Etidronat im wesentlichen durch Veränderungen der chemischen Struktur unterscheiden und deren antiresorptive Potenz vergleichsweise bis zu 10.000 mal größer ist (Abb. 2). Man unterscheidet demzufolge Bisphosphonate der 1., 2. und 3. Generation (Bauss aus (60) S. 1-10). Allerdings ist zu erwähnen, dass der Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität zur Zeit nur teilweise erklärt werden kann. Die Bindung an das Mineral ist offenbar durch die P-C-P Struktur bedingt, während die antiresorptive Wirkung sowohl von der P-C-P Struktur, als auch der Struktur der Seitenketten und damit von der dreidimensionalen Struktur beeinflusst wird. Hilfreich für die Entwicklung weiterer Substanzen ist die Tatsache, dass die bei der Ratte untersuchte und die beim Menschen gemessene Wirkstärke recht gut übereinstimmen (32).

## Literaturübersicht

1. Generation		2. Generation		3. Generation	
~ 1x	~ 10x	~ 100x	> 100- < 1000x	> 1000- < 10 000x	> 10 000x
Etidronat	Clodronat Tiludronat	Neridronat Pamidronat	Alendronat Olpadronat	Ibandronat Risedronat	Minodronat Zoledronat

Abb. 2: Antiresorptive Potenz verschiedener Bisphosphonate im Vergleich zu Etidronat

### 2.3.4. Wirkmechanismus

Die Wirkung *in vivo* wird größtenteils, wenn nicht sogar vollständig, durch zelluläre Mechanismen und nicht durch die physikalisch-chemische Hemmung der Kristallauflösung vermittelt (106). Die genaue Art dieser Mechanismen ist allerdings noch unbekannt und es ist gut möglich, dass mehrere Mechanismen gleichzeitig wirken. 3 Arten sind hierbei zu unterscheiden:

1. Auf der Ebene von Gewebe ist der Haupteffekt der Bisphosphonate eine Abnahme des Knochenbaus und damit des Knochenverlustes.
2. Auf zellulärer Ebene bewirken sie:
  - a) Eine Hemmung der Osteoklastenrekrutierung
  - b) Möglicherweise eine Hemmung der Osteoklastenadhäsion
  - c) Eine Verkürzung der Lebensspanne der Osteoklasten durch eine vorzeitige Apoptose
  - d) Eine Hemmung der Osteoklastenaktivität
3. Die geringen Konzentrationen, die auf molekularer Ebene für die Aktivität der Bisphosphonate nötig sind, lassen eine Art „Tasche“ vermuten, die einen zellulären Umwandlungsmechanismus induziert. Sie könnte sich auf der Zellmembran oder im Innern der Zelle befinden und die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase enthalten, von der man weiß, dass stickstoffhaltige Bisphosphonate sie zu hemmen vermögen.

Bisphosphonate können Osteoklasten direkt und indirekt beeinflussen.

Der direkte Weg resultiert aus ihrer zellulären Bindung oder intrazellulären Aufnahme.

Die Bisphosphonate werden wegen ihrer starken Affinität zum Mineral auf den Knochen abgelagert und die Osteoklasten erst dann gehemmt, wenn sie beginnen, das bisphosphonathaltige Mineral zu resorbieren. Dieser Vorgang wird zudem durch die Tatsache begünstigt, dass sich die Bisphosphonate vorzugsweise unter den Osteoklasten ablagern, wo sie sehr hohe Konzentrationen erreichen können, die im Bereich von  $10^{-4}$  Mol oder sogar höher liegen. Dies erklärt, warum eine Einmalgabe von Bisphosphonaten auch über längere Zeit wirksam ist (107, 32).

Seit langem ist bekannt, dass durch Bisphosphonate die Morphologie der Osteoklasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verändert wird. Die Veränderungen sind zahlreich und können sich auf das Zytoskelett, Aktin und Vinculin oder eine Unterbrechung des Bürstensaums auswirken (50).

Bisphosphonate induzieren weiterhin *in vitro* viele biochemische und enzymatische Veränderungen, die jedoch auf die Knochenresorption *in vivo* meist keine Korrelation aufweisen. Zu den Wirkungen auf die Osteoklasten im Speziellen gehören eine Hemmung der Säureextrusion durch einen Natrium unabhängigen Mechanismus und eine Hemmung der im Bürstensaum vorhandenen Protonen-ATPase vom vakuolären Typ. Auch eine Hemmung bestimmter Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPase), genauer PTPase  $\epsilon$  und  $\sigma$ , ist beschrieben worden. Die Abnahme der Säureproduktion könnte eine der möglichen Ursachen der verminderten Knochenzerstörung sein (103).

Stickstoffhaltige Bisphosphonate können den Mevalonat-Stoffwechselweg hemmen, indem sie die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase verhindern. Das führt schließlich zu einer verminderten und veränderten Zellaktivität der Osteoklasten und zu ihrer vorzeitigen Apoptose (125, 69, 107).

Indirekt beeinflussen Bisphosphonate die Osteoklasten über andere Zellen.

An erster Stelle stehen hierbei die Osteoblasten. Fest steht, dass Zellen osteoblastischer Abstammung die Rekrutierung und Aktivität der Osteoklasten kontrollieren. Bisphosphonate veranlassen Osteoblasten, vermehrt Hemmer der Osteoklastenrekrutierung und damit der Knochenresorption zu synthetisieren. Die Zielzelle dieses indirekten Wirkmechanismus ist in diesem Falle also primär der Osteoblast (109, 126).

## Literaturübersicht

Aber auch Makrophagen können die Zielzellen der Bisphosphonate sein. Makrophagen setzen zahlreiche knochenresorbierende Zytokine frei, die in der Lage sind, Osteoklasten zu modulieren. Unter bestimmten Bedingungen hemmen Bisphosphonate in vitro die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ .

Derzeit ist noch unbekannt, welcher der beiden Wirkmechanismen, der direkte Effekt auf den Osteoklasten oder die indirekte Wirkung durch den Osteoblasten, in vivo der wichtigere ist.

### 2.3.5. Pharmakokinetik

Bisphosphonate sind synthetische Verbindungen, deren natürliches Vorkommen bislang weder bei Mensch noch Tier beobachtet wurde. Es gibt keine Enzyme, die in der Lage sind, ihre P-C-P Bindung zu spalten und sie sind nicht biologisch abbaubar. Sie werden absorbiert, gespeichert und unverändert wieder ausgeschieden.

#### 2.3.5.1. Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit eines oral verabreichten Bisphosphonates ist sehr gering und liegt zwischen weniger als 1% und 10%. Dies ist auf die geringe Lipophilie und die hohe negative Ladung des Moleküls zurückzuführen, was den trans- und parazellulären Transport in die Mukosa verhindert. Die Absorption erfolgt offenbar durch passive Diffusion, möglicherweise über einen parazellulären Weg, sowohl im Magen als auch im Dünndarm. Sie ist herabgesetzt, wenn das Medikament mit den Mahlzeiten eingenommen wird, insbesondere zusammen mit Calcium, Eisen, Milch, Orangensaft oder Kaffee (32).

#### 2.3.5.2. Verteilung

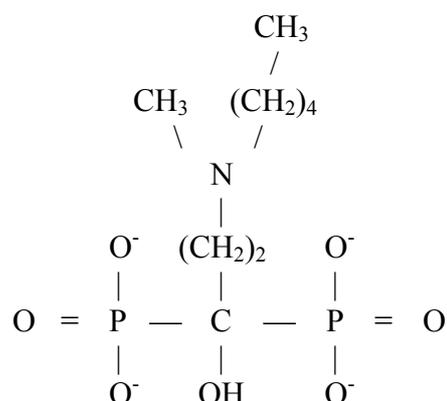
Im Blut sind Bisphosphonate nur teilweise ultrafiltrierbar. Die nicht filtrierbare Fraktion ist entweder an Proteine gebunden, oder sie liegt in Form kleinster Aggregate vor. Etwa 20% bis 80% der absorbierten Bisphosphonate werden dann vom Knochen aufgenommen und der Rest aktiv mit dem Harn ausgeschieden. Die Halbwertszeit zirkulierender Bisphosphonate ist kurz. Sie liegt bei der Ratte im Minutenbereich und beim Menschen zwischen 0,5 Stunden bis 2 Stunden. Die Aufnahme der Bisphosphonate in den Knochen erfolgt bereits bei der ersten

## Literaturübersicht

Passage vollständig. Sie lagern sich sowohl in Regionen der Knochenneubildung als auch des Knochenabbaus ab. Die Akkumulation im Skelett erreicht bei chronischer Applikation erst nach sehr langer Zeit ein Plateau, möglicherweise erst nach Jahrzehnten. Demgegenüber wird das Plateau der antiresorptiven Wirkung relativ schnell erlangt und ist dosisabhängig. Da die Bisphosphonate die Resorption des Knochens in dem sie abgelagert werden verlangsamen, hängt ihre Halbwertszeit im Körper von der Knochenumbaurate selbst ab. Bei der Ratte liegt die Retentionszeit zwischen 3 Monaten und 1 Jahr und beim Menschen über 10 Jahre, eventuell sogar lebenslang (107).

### 2.3.6. Das Bisphosphonat Ibandronat (BM 21.0955)

Mit der Entwicklung von Ibandronat, einem Bisphosphonat der 3. Generation, ist das derzeit potenteste Bisphosphonat seiner Klasse, das sich in klinischer Anwendung befindet und für das entsprechende Daten publiziert wurden, gefunden worden (9, 29).



[1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)propyliden]bis-phosphonat

Chemische Struktur von Ibandronat

#### 2.3.6.1. Pharmakodynamisches Profil

Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel

*Studien an Tiermodellen*

## Literaturübersicht

In einer Studie über die Hemmung von Arotinoid stimulierter Knochenresorption bei thyreo-parathyreoidektomierten Ratten, wurde Ibandronat mit Clodronat, Pamidronat und Alendronat verglichen. Bei der Dosierung, die eine 100%ige Hemmung bewirkte, war Ibandronat 500, 50 und 10-fach potenter als die Vergleichssubstanzen. In einem separaten Experiment war Ibandronat 2-fach potenter als Risedronat (83, 29, 11).

Die subcutane Gabe von Ibandronat (0,1, 1 und 10µg/kg/Tag) über 11 Tage, an gesunde, weibliche Ratten, hemmte die Knochenresorption ( $p < 0,01$  bis  $0,001$  gegenüber der Kontrollgruppe), was durch Abzug der Calciumretention von der Knochenformation berechnet wurde. Weiterhin führte die Gabe von Ibandronat in der Dosierung von 1 und 10µg/kg/Tag auch zu einer signifikanten Zunahme der intestinalen Calciumabsorption und Calciumbalance. Nur die höchste Dosierung bewirkte auch eine Abnahme der Knochenformation und eine Zunahme der Calciumausscheidung mit dem Harn ( $p < 0,05$  bis  $0,01$  gegenüber der Kontrollgruppe).

Auch die Wirkungsdauer von Ibandronat wurde in dieser Studie untersucht. Eine Einzeldosis Ibandronat wurde 3 Tage verabreicht (10µg/kg) oder 30 Tage lang (10 und 100µg/kg), vor den kinetischen Calciummessungen. Die Wirkung von Ibandronat 100, nicht aber von 10µg/kg, auf die Calciumkinetik war noch 30 Tage nach der Verabreichung ( $p < 0,01$  gegenüber der Kontrollgruppe) sichtbar: Die netto intestinale Calciumabsorption, die Calciumausscheidung mit dem Harn und die Calciumbilanz stiegen an und die Knochenresorption ging zurück. Die Wirkung der 10µg/kg Dosis war 3 Tage nach der Applikation sichtbar (33, 29, 11).

Um die Auswirkungen einer Behandlung mit Ibandronat auf den Knochenverlust, Knochenqualität, biomechanische Möglichkeiten und die Knochenkonzentrationen bei ovariectomierten Ratten zu untersuchen, wurden 165 Tieren 10 Wochen nach diesem Eingriff subcutane Dosen Ibandronat von 0,2, 1,0, 5,0 oder 25µg/kg/Tag über 12 Monate appliziert, bzw. 25 oder 125µg/kg alle 25 Tage, was in der Gesamtdosis den täglich verabreichten Mengen von 1,0 oder 5,0µg/kg entsprach. Bis zum Behandlungsbeginn bewirkte die Ovariectomie eine signifikante Reduktion der Knochenmasse ( $p \leq 0,0001$ ) und Festigkeit ( $p < 0,05$ ). Ibandronat verhinderte die weitere Abnahme der Knochenmasse, eine Verschlechterung der Architektur und Festigkeit, als dieser beträchtliche Knochenverlust bereits eingesetzt hatte. Die optimale Dosis lag bei 0,2 bis 1,0µg/kg/Tag, wobei die kumulative Gesamtdosis eher über die Effizienz zu entscheiden schien als das Behandlungsschema. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für

## Literaturübersicht

die biomechanischen Eigenheiten erhalten, wobei hier die wirksamste Dosis bei  $0,2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  lag. Die Knochenkonzentrationen von Ibandronat waren linear mit der Dosis (10).

Ibandronat (subcutan  $0,1, 0,3, 1, 10$  und  $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  über 1 Monat) verabreicht an ovariectomisierte Hunde, verhinderte den Knochenverlust (bei einer Dosierung von  $\geq 1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ), die Zunahme der Knochenerosionstiefe ( $\geq 3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ), des Osteoidvolumens und seiner Oberfläche ( $\geq 0,1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ). Außerdem beugte Ibandronat einem Abfall des Serum  $1,25\text{-dihydroxyvitamin D Levels}$  vor ( $\geq 0,3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ), was bei der Placebogruppe beobachtet wurde. Mineralisierte Oberflächen waren nur bei Ibandronat  $10$  und  $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  ( $p < 0,01$ ) signifikant reduziert. Hingegen wurden keine signifikanten Veränderungen bei der Osteoklastenoberfläche oder ihrer Zahl, dem Serumspiegel von Calcium, Phosphor, Parathyroidhormon oder Osteocalcin beobachtet. Ebenso wurden keine Anzeichen einer Osteomalazie gefunden (80, 29, 11).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, haben Monier-Faugere et al. (81) in einer weiteren Studie ovariectomisierten Hunden 4 Monate nach dem Eingriff über 1 Jahr täglich (5 von 7 Tagen) eine Dosis Ibandronat der Stärke  $0, 0,8, 1,2, 4,1$  und  $14\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  oder eine unterbrochene Therapie von  $65\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  2 Wochen lang und dann 11 Wochen Pause verabreicht. 4 Monate nach der Kastration wurde bei diesen Tieren ( $p < 0,05$ ) eine signifikante Abnahme des Knochenvolumens festgestellt. Dosen von  $\geq 4,1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  hielten den Knochenverlust auf oder verkehrten ihn sogar ins Gegenteil. Der Knochenumbau (Aktivierungsfrequenz) war bei den Hunden, die Ibandronat in der Dosierung  $14\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$  erhielten, deutlich verringert. Dieser Effekt wurde von einer signifikant höheren Kristallgröße, einem höheren Verhältnis Mineral/Grundsubstanz und einer einheitlicher mineralisierten Knochenmatrix im Vergleich zur Kontrollgruppe mit nicht ovariectomisierten Hunden begleitet. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Zunahme der sekundären Mineralisation eine Rolle im Gewinn der Knochenmineraldichte, verbunden mit einer Bisphosphonatbehandlung, spielt. Ferner zeigte die Studie, dass die kontinuierliche und unterbrochene Therapie einen ähnlichen Effekt auf das Knochenvolumen hatten, wobei die unterbrochene Therapie etwas restriktiver bezüglich der Umbaurate und Mineralisation war.

In einer Studie von Smith et al. (116) wurden 66 erwachsene Affen ovariectomiert und erhielten in 30-Tage Intervallen für 16 Monate eine intravenöse Bolusinjektion Ibandronat in Höhe von  $10, 30$  oder  $150\mu\text{g}/\text{kg}$ . Die  $30\mu\text{g}/\text{kg}$  Dosis beugte einer Osteopenie durch Östrogenmangel vor. Eine ovx induzierte Zunahme des Knochenumbaus wurde durch die Behandlung unter-

## Literaturübersicht

drückt und Knochenmasse, Architektur und Festigkeit wurden in klinisch relevanten Regionen erhalten. Die Behandlung mit der 150µg/kg Dosis bewirkte eine weitere Zunahme der Knochenmasse und verbesserte die Knochenfestigkeit sowohl an der Wirbelsäule als auch am Oberschenkelhals, ohne jedoch die Knochenqualität nachteilig zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu beugte die 10µg/kg Dosis nur teilweise den ovx induzierten Effekten vor. Smith schließt aus seinen Ergebnissen, dass diese Daten die Leistungsfähigkeit für eine Langzeitgabe von Ibandronat in Form einer unterbrochenen Bolusinjektion bei Menschen in der Vorbeugung der Osteoporose stützen und die Knochenqualität zudem verbessern.

Kurth et al. (61, 62) bewiesen in ihren Versuchsreihen, dass eine Therapie mit Ibandronat sowohl die Knochenmasse als auch die Knochenstabilität in Tumorosteolysen erhält. Dazu wurde 123 Ratten das Walker Karzinom 256 chirurgisch in den Femur implantiert und die in verschiedene Gruppen aufgeteilten Tiere mit Ibandronat in verschiedenen zeitlichen Abfolgen und Kombinationen behandelt. Sowohl die präventive als auch die interventionelle Therapie bewirkte eine Zunahme der Knochenmineraldichte und des Knochenmineralgehalts. Eine Kombinationstherapie sicherte jedoch die größte Protektion gegen tumorinduzierte Komplikationen im Knochen.

In einer Langzeitstudie wurde Ibandronat hinsichtlich seiner Sicherheit und seiner Wirksamkeit auf die Knochenqualität der Lendenwirbel bei Ratten untersucht. Insgesamt 400 weibliche und männliche Tiere erhielten über 104 Wochen jeden Tag oral 3, 7 oder 15mg/kg Ibandronat. Verglichen mit der Kontrollgruppe war die Knochenmineraldichte, die Druckfestigkeit und Steifheit bei den mit Ibandronat behandelten Tieren signifikant höher, wohingegen keine Veränderungen in Art oder Betrag der Elastizität vorkamen. Die Zunahme der Wirbelkörperbelastung war eindeutig und Veränderungen der mechanischen Eigenschaften schienen hauptsächlich von der vermehrten Knochenmasse zu kommen. Des Weiteren belegt die Studie, dass eine lebenslange Gabe von Ibandronat, sogar von Dosen, die weit über das therapeutisch notwendige Maß hinaus gehen, nicht nur gut vertragen werden, sondern auch die Knochenqualität leicht verbessern (63, 29, 11).

### *Studien am Menschen*

Zahlreiche Phase-II/III-Studien (90) bestätigen die Wirkungen von Ibandronat auf den Knochenstoffwechsel, die bereits zuvor in Tiermodellen gefunden wurden. So untersuchten

## Literaturübersicht

Adami et al. (1) in einer Phase-III-Studie die Veränderungen der Knochenmineraldichte in der Lendenwirbelsäule von 520 postmenopausalen Frauen, die vierteljährlich eine 1mg bzw. 2mg intravenös verabreichte Bolusinjektion Ibandronat erhielten. Nach 1 Jahr hatte die 2mg Dosis eine Zunahme der Knochenmineraldichte um 5% bewirkt und die Dosis von 1mg eine Zunahme um 3% ( $p < 0,0001$ ). Ein Anstieg der Knochenmineraldichte wurde ebenfalls am Oberschenkelhals und Trochanter beobachtet. Ibandronat rief zudem einen signifikanten Rückgang bei den Markern des Knochenumbaus hervor, wobei die 2mg Dosis signifikant effektiver und langanhaltender wirkte als die Dosis von 1mg. Das Ausmaß der Veränderungen von Knochenmineraldichte und Knochenmarkern mit der 2mg Bolusinjektion alle 3 Monate war mit Ergebnissen bei oraler Gabe vergleichbar (101, 28).

Riis et al. (101) verglichen die Wirksamkeit und Sicherheit einer intermittierenden oralen Gabe Ibandronat mit einer kontinuierlichen täglichen Gabe beim Menschen. Dazu wurden 240 spätmenopausale Frauen mit manifester Osteoporose in 3 Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine kontinuierliche Therapie von 2,5mg Ibandronat täglich, die zweite Gruppe erhielt eine intermittierende Therapie mit 20mg Ibandronat jeden 2. Tag für die ersten 24 Tage, gefolgt von einer 9 wöchigen Medikamentenpause und die dritte Gruppe erhielt eine pharmakologisch unwirksame Substanz. Nach 24 Monaten zeigte sich, dass die intermittierende Behandlung mit Ibandronat ebenso effektiv war wie die kontinuierliche. Das galt sowohl für die signifikante Zunahme der BMD an der Wirbelsäule und Hüfte, als auch für die signifikante Abnahme der Marker des Knochenumbaus. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse vorangegangener präklinischer Studien (81, 116), dass die Wirksamkeit von Ibandronat eher von der Gesamtdosis als von dem Behandlungsschema abhängt. Das ermöglicht flexiblere Dosierungsregime, die wiederum zu einer höheren Akzeptanz und verbesserten Langzeitcompliance bei Patienten führt.

### Wirkungen auf die Nierenfunktion

Um die Wirkung von Ibandronat auf die Nierenfunktion im Vergleich zu anderen Bisphosphonaten zu testen, wurde es subcutan in einer Dosis von 1mg/kg/Tag über 9 Tage an Ratten verabreicht. Die gesamte Menge Malatdehydrogenase (einem frühen Marker von Nierentoxizität), die mit dem Urin ausgeschieden wurde, lag nach der Gabe von Ibandronat bei 22,7 Einheiten und jeweils 13,4, 18,5, 18,9, 22,8 und 27,9 Einheiten nach der Gabe von Pamidro-

## Literaturübersicht

nat, Etidronat, Alendronat, Risedronat und Clodronat und war generell innerhalb des Toleranzbereiches, der bei den Tieren der Kontrollgruppe beobachtet wurde (4,9 bis 24,2).

Weiterhin wurde in dieser Studie die therapeutische Breite untersucht, indem das nephrotoxische Potential mit dem antiresorptiven Effekt verglichen wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die therapeutische Breite für Ibandronat ungefähr 2, 6, 45, 1300 und 13000mal größer war als für Risedronat, Alendronat, Pamidronat, Clodronat und Etidronat (42).

Ibandronat wirkt auf die gleiche Weise wie andere Aminobisphosphonate, hat aber eine wesentlich höhere Affinität zur Knochenmatrix. Diese Eigenschaft bietet Vorteile hinsichtlich der Verträglichkeit und der Art der Verabreichung. So ist eine intravenöse Bolusinjektion alle 3 Monate von 2-6mg nicht nur extrem effektiv in der Behandlung postmenopausaler Frauen mit Osteoporose, sondern aufgrund der geringen Menge der Substanz auch absolut verträglich für die Nieren. Eine Schädigung der Nieren, dem Organ, das durch Toxizität am meisten gefährdet ist, kann praktisch ausgeschlossen werden und die Dosierung muss auch bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion nicht reduziert werden (122, 29, 71).

### 2.3.6.2. Pharmakokinetisches Profil

Die pharmakokinetischen Parameter wurden nach einmaliger Injektion von 0,5, 1,0, bzw. 2,0mg Ibandronsäure an gesunden Probanden, bzw. nach einmaliger Infusion von 2,0, 4,0, oder 6,0mg Ibandronsäure bei 20 postmenopausalen Frauen ermittelt. Die folgenden pharmakokinetischen Daten wurden unabhängig von der Dosis ermittelt:

Terminale Halbwertszeit:	10 – 16 Stunden
Gesamtkörper-Clearance:	130 ml/min
Renale Clearance:	88 ml/min
Renale Wiedergewinnung (0-32 Stunden):	60%
Scheinbares Verteilungsvolumen:	150 l

Die Ausscheidung von Ibandronsäure erfolgt in zwei Phasen: Die intravenös verabreichte Substanz wird unverändert zum größten Teil (60%) über die Nieren ausgeschieden. Die Restmenge ist an das Knochengewebe gebunden.

Nach Infusion von 2, 4 und 6mg Ibandronsäure über 2 Stunden zeigen sich die pharmakokinetischen Parameter dosisproportional. Die höchste erreichte Serumkonzentration betrug nach

einmaliger, zweistündiger Infusion von 6mg 328 ng/ml und nach einmaliger intravenöser Injektion von 2mg 246 ng/ml.

Die Plasmaproteinbindung ist unabhängig von der Serumkonzentration. Bis zu einer Konzentration von 2000ng/ml beträgt die Proteinbindung 99%. Solche Serumspiegel werden bei therapeutischen Dosen jedoch nicht erreicht.

Eine langdauernde Bindung von Ibandronsäure an das Knochengewebe kann angenommen werden, jedoch liegen hierzu noch keine klinischen Daten vor (29, 102, 92).

Ravn et al. (99, 97) nutzten eine Dosis-Findungs-Studie bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose, um den Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen Eigenschaften von oral verabreichtem Ibandronat und der klinischen Reaktion auf die Knochenmasse und den Knochenumbau zu untersuchen. Hierfür wurden Blutproben 20, 60, 120, 240 und 360min nach der ersten und letzten Gabe von Ibandronat gewonnen. Per ELISA wurde die Konzentration der Ibandronsäure im Serum bestimmt. Die Konzentrations-Zeit-Kurven (ausgedrückt als das Gebiet unter der Kurve über die gesamte Sammelperiode hinweg (AUC(0-360min))) zeigten ein hoch signifikantes Dosis-Reaktions-Verhältnis ( $p < 0.0001$ ) und ein lineares pharmakokinetisches Verhalten. Eine anfängliche Halbwertszeit im Serum, welche die Verteilung und frühe Ausscheidung repräsentierte, betrug 1,3 Stunden. Das Fließgleichgewicht (AUC) nahm um den Faktor 2,5 zu, welcher mit der offensichtlichen Ausscheidungs-Halbwertszeit von 32,6 Stunden und einem Dosisintervall von 24 Stunden vereinbar ist. Es gab hinsichtlich der Knochenmarker einen exponentiellen Zusammenhang zwischen der AUC und der Veränderung von den Ausgangswerten bis zum 12. Monat, wobei alle Marker maximal gesenkt wurden. Mit diesen Daten wurden erstmals hoch signifikante Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Eigenschaften von einem Bisphosphonat und der klinischen Reaktion auf Knochenmasse und Knochenumbau nachgewiesen.

### 2.3.6.3. Nebenwirkungen

Nach intravenöser Gabe von Ibandronat tritt als häufigste unerwünschte Wirkung ein Anstieg der Körpertemperatur auf (bis zu 20%). Gelegentlich (ca. 3%) wird auch über ein grippeähnliches Syndrom mit Fieber, Schüttelfrost, Knochenschmerzen oder muskelkaterähnliche Schmerzen berichtet. In den meisten Fällen ist keine spezielle Behandlung erforderlich und

die Symptome bilden sich nach einigen Stunden oder Tagen zurück. In Einzelfällen wurde über gastrointestinale Unverträglichkeiten berichtet (92).

In einer bedeutenden Phase-III-Studie von Delmas et al. (28), in welcher ein Sicherheitsprofil des oberen Magen-Darm-Traktes von oral täglich und intermittierend verabreichtem Ibandronat bei 2.946 postmenopausalen Frauen erstellt wurde, wurden beide Therapiekonzepte gut vertragen und waren nicht mit einem erhöhten Risiko gastrointestinaler Unverträglichkeiten verbunden, obwohl Patientinnen, die bereits vor Therapiebeginn unter Störungen des oberen Magen-Darm-Traktes litten, nicht von der Studie ausgeschlossen wurden.

Die verminderte Calciumausscheidung im Urin geht häufig mit einer nicht behandlungsbedürftigen Abnahme des Serumphosphatspiegels einher. Der Serumcalciumspiegel kann auf hypocalcämische Werte abfallen (berichtet bei ca. 3% der Patienten in klinischen Studien) (102).

### 2.3.6.4. Therapeutischer Einsatz von Ibandronat bei Osteoporose

Bislang ist Ibandronat als Ibandronsäure (Bondronat<sup>®</sup>) nur zur Behandlung der tumorinduzierten Hypercalcämie mit oder ohne Metastasen zugelassen. Aufgrund der vielversprechenden Studienergebnisse steht Ibandronat jedoch unmittelbar vor der Zulassung für die Indikation Osteoporose.

In einer Phase-II-Studie wurde die Wirksamkeit von verschiedenen Dosen Ibandronat auf die Knochenmasse und Knochenmarker getestet. 180 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose wurde deshalb über 12 Monate täglich oral eine Menge von 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 oder 5mg Ibandronat verabreicht, mit dem Ergebnis, dass die Behandlung mit Ibandronat die Knochenmasse aller Skelettregionen in einer dosisabhängigen Weise hat zunehmen lassen, wobei die 2,5mg Dosis am effektivsten war. Die Behandlung reduzierte den Knochenumbau auf ein prämenopausales Niveau und wurde gut vertragen (99, 98).

Im Rahmen der BONE Studie (oral iBandronat Osteoporosis vertebral fracture study in North America and Europe) wurde die Wirksamkeit einer täglichen oralen Gabe von Ibandronat mit der einer intermittierenden oralen Gabe verglichen. 2.946 postmenopausale Frauen mit verminderter Knochendichte und mindestens einer osteoporotischen Fraktur, erhielten entweder 2,5mg Ibandronat täglich oral oder alle 3 Monate 12 x 20mg Ibandronat oral jeden 2. Tag oder Placebo. Nach 3 Jahren konnte das Frakturrisiko um 62% (tägliche Gabe) bzw.

## Literaturübersicht

50% (intermittierende Gabe) reduziert werden. Diese Unterschiede waren gegenüber der Placebogruppe hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Gleichzeitig nahm die Knochendichte von Lendenwirbelsäule und Schenkelhals sowohl unter der täglichen als auch unter der intermittierenden Dosierung signifikant zu ( $p < 0,0001$ ). Beide oralen Dosierungsschemata waren gut verträglich (28, 90).

Um die Wirksamkeit einer intravenösen Bolusinjektion von Ibandronat bei postmenopausaler Osteoporose zu testen, erhielten 125 Frauen Ibandronat in einer Dosierung von 0,25, 0,5, 1 oder 2mg alle 3 Monate. Nach 1 Jahr konnte eine deutliche Zunahme der Knochenmineraldichte festgestellt werden, die auf eine dosisabhängige Hemmung der Knochenresorption zurückzuführen ist (122).

Bei 520 postmenopausalen Frauen, die entweder 1mg oder 2mg Ibandronat einmal pro Quartal als Bolusinjektion oder Placebo erhielten, war die Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule nach 1 Jahr in der 2mg Gruppe um 5% angestiegen, in der 1mg Gruppe um 3% und in der Placebogruppe um 0,25%. Die Zunahme der Knochenmineraldichte unter 2mg Ibandronat i.v. war sowohl gegenüber Placebo als auch der 1mg Dosis hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Der Anstieg der Knochenmineraldichte und der Rückgang der Knochenmarker, welche unter der 3-monatigen Gabe von 2mg Ibandronat i.v. erzielt wurden, war vergleichbar oder sogar größer als der Anstieg unter 2,5mg Ibandronat täglich oral bzw. 20mg Ibandronat intermittierend oral (1, 90).

Es ist nachgewiesen, dass sich in Folge einer Transplantation häufig eine Osteoporose entwickelt. Grotz et al. (44) bewiesen, dass 4 Bolusinjektionen Ibandronat im Abstand von 3 Monaten ausreichen, um dem Fortschreiten einer durch eine Transplantation verursachten Osteoporose vorzubeugen.

Die hohe Wirksamkeit von Ibandronat bietet aufgrund der intravenösen Bolusinjektion alle 3 Monate daher nicht nur Vorteile gegenüber anderen Bisphosphonaten, die als Infusion appliziert werden müssen, sondern vielmehr auch eine interessante Alternative zur Behandlung ambulanter Patienten in Hinblick auf deren Compliance. Eine volle Bioverfügbarkeit wird gewährleistet und gastrointestinale Beschwerden können vermieden werden (32).

### 2.4. Endoprothetik

#### 2.4.1. Einsatz von Endoprothesen

Heutzutage gehört die Implantation von Endoprothesen in der orthopädischen Chirurgie zur Routine. Bei Menschen werden weltweit jährlich etwa 1,5 Millionen Hüftgelenke implantiert, davon etwa 120.000 in Deutschland (Kurth aus (60) S. 125). Auch bei Hunden hat sich der Einsatz künstlicher Hüftgelenke in den vergangenen 20 Jahren etabliert (87). Dieser künstliche Gelenkersatz lindert die Schmerzen der Betroffenen ganz erheblich und trägt zu einer schnellen Verbesserung der Lebensqualität bei den meisten Patienten bei (64, 87).

#### 2.4.2. Primäre Stabilität

Für die optimale Funktion einer Endoprothese ist die stabile Fixation im Knochen schon bei der Implantation eine unabdingbare Voraussetzung. Zur Zeit werden 2 Methoden routinemäßig angewandt, um diese initiale Fixation zu erreichen (7):

- a) Die Endoprothese wird in den Knochen einzementiert
- b) Die Endoprothese wird zementfrei im Knochen verklemmt

#### 2.4.3. Sekundäre Stabilität / Osteointegration

Nach der stabilen Fixation der Endoprothese im Knochen und der dadurch erreichten primären Stabilität, hängt der Langzeiterfolg eines solchen Eingriffes maßgeblich von der Osteointegration (sekundäre Stabilität) ab. Die Osteointegration im Sinne Branemarks (14) ist eine direkte Berührung des Knochens mit der Oberfläche des Implantats ohne dazwischenliegendes fibröses Gewebe. Steinemann (118) fordert die funktionelle Integrität und Baier (6) sieht ein Implantat nur dann als osteointegriert an, wenn beim Versuch der Implantatentfernung eher eine Fraktur des Knochens als des Interfaces auftritt (41). Zu der qualitativen Stabilisierung kommt somit eine quantitative Komponente hinzu, die eine Dauerstabilität der Prothese gewährleistet. Mechanische Belastungen mit Bewegungen an der Implantat-Knochen-Grenze

führen im Sinne einer Pseudarthrose zu einer Bindegewebsbildung in diesem Bereich. Die zur sekundären Stabilisierung notwendige Osteointegration wird dadurch verhindert und es resultiert eine frühzeitige Lockerung des Implantats. Pilliar et al. (95) fanden anhand zweier Hundestudien heraus, dass bei Bewegungen von  $<28\mu\text{m}$  eine komplette Osteointegration stattfindet, wohingegen bei Bewegungen von  $>150\mu\text{m}$  lediglich eine Bindegewebschicht an der Knochen-Implantat-Grenze ohne knöcherne Osteointegration ausgebildet wird. Der Prozess von der Primärstabilität zur Sekundärstabilität durchläuft drei sich überlappende Phasen: Die erste Phase nach der Prothesenimplantation dauert wenige Wochen und ist gekennzeichnet durch Knochennekrosen, die als Folge der Gefäß-, Knochen- und Gewebeerstörung bei der Präparation des Implantatbettes auftreten. Die zweite Phase dient der Reparatur und Integration des Implantats in den Knochen. An der Grenze zwischen lebendem Knochen und abgestorbenem Knochen erscheinen Gefäßerweiterungen, polymorphkernige Zellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten. Das abgestorbene Knochengewebe wird von Granulationsgewebe und Bindegewebe infiltriert und neue Knochensubstanz wird dem abgestorbenen Knochen aufgelagert. Die dritte Phase kann bis zu zwei Jahre andauern und dient der Stabilisierung der Prothese. Der Heilungsprozess findet sein Ende, sobald das abgestorbene Knochenmaterial restlos abgebaut und durch gewobenen und lamellären Knochen ersetzt ist (129).

#### 2.4.4. Zementfreie Prothesen

Die Erkenntnis, dass es bei vielen zementierten Implantaten nach 10 bis 20 Jahren, speziell bei jungen Patienten, zu einer Implantatlockerung kommt, führte zu der Entwicklung von zementfreien Prothesen mit rauhen Enden, porösen Oberflächen oder bioaktiven Beschichtungen, mit der Absicht, das Knochenein- und anwachsen auf diese Weise zu stimulieren (7). Zementfreie Implantate werden durch eine Verankerung, entweder durch ihren distalen Anteil im intramedullären Kanal in der Diaphyse (kortikaler Knochen), oder in der proximalen Metaphyse des Trochantermassives stabilisiert. Eine zementfreie Endoprothese muss frühzeitig eine sekundäre Stabilität erlangen, der periprothetische Knochen vor einer Osteopenie durch „stress shielding“ bewahrt und aseptische Lockerungen, induziert durch Abriebpartikel, verhindert werden (Kurth aus (60) S. 125).

### 2.4.5. Bioaktive Oberflächenbeschichtungen

Durch das Auftragen von knochenleitenden Substanzen auf die Implantatoberfläche kommt es im Vergleich mit derselben Grundsubstanz ohne Beschichtung zu einer deutlich gesteigerten Knochenanlagerung. Dieser schnell gebildete Knochen auf der Oberfläche erhöht früh die mechanische Stabilität der Prothese (7).

Die Verbesserung der Eigenschaften beschichteter Bauteile beruht auf einer Funktionstrennung zwischen Schicht und Substrat. Die Schicht übernimmt Kontaktfunktionen, sodass sie die Eigenschaften des Bauteils hinsichtlich Verschleißbeständigkeit, tribologischem Verhalten, Wärmeübergang- bzw. dämmung, elektrischer Leitfähigkeit oder Isolation, Aussehen oder hinsichtlich des biologischen Verhaltens bestimmt, während das Substrat meist die Tragfunktion übernimmt. Da das Substrat keine Kontaktfunktion zu erfüllen hat, können seine Eigenschaften den mechanischen Bedürfnissen optimal angepasst werden, ohne mögliche Oberflächenwechselwirkungen berücksichtigen zu müssen (86).

Nicht alle Beschichtungen haben die gleiche biologische Aktivität oder Beständigkeit. Die knochenleitende Aktivität und Beständigkeit hängen, neben vielen anderen Variablen, von der Zusammensetzung, Dichte und Dicke der Beschichtung, der Bindungskraft an das Substrat und der Substrattextur ab (7).

Die Oberflächenbeschaffenheit spielt für die Osteointegration von orthopädischen- und Zahnimplantaten eine ganz entscheidende Rolle. Das wurde während der letzten 15 Jahre in zahlreichen wissenschaftlichen Studien nachgewiesen. Calcium/Phosphat Beschichtungen auf bioinertem Material haben es ermöglicht, die Vorteile der biologischen Möglichkeiten von CaP und die biomechanischen Möglichkeiten des Metalls zu verbinden (120).

### 2.4.6. Hydroxylapatit

Das in der Implantologie von Hartgewebeimplantaten etablierteste bioaktive Material ist das Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . Als Bestandteil der Knochengrundsubstanz hat es eine osteogene Wirkung, sodass die Bildung von Knochengewebe stimuliert wird und eine Verbundosteogenese auftritt. Das Hydroxylapatit (HA) wird vom Knochen verdrängt und ersetzt.

## Literaturübersicht

Die Herstellung von HA-Implantaten erfolgt entweder durch Atmosphärisches Plasmaspritzen (APS) oder Vakuum Plasmaspritzen (VPS), wobei der pulverförmige Spritzwerkstoff mittels eines Plasmastrahls aufgeschmolzen und beschleunigt wird (86). Dabei entstehen Schichtsysteme mit charakteristischem Schichtaufbau, deren Dicke üblicherweise im Bereich von 20-200µm liegt. Mikroskopisch sind typischerweise kugelförmige Partikel unterschiedlicher Größe und teilweise verschmolzene Bereiche zu erkennen (49). Von dieser unregelmäßigen Oberfläche, die den natürlichen Verhältnissen ähnlich ist, erhofft man sich ein besseres Einwachsvverhalten des Knochens an das Implantat.

Hydroxylapatitbeschichtungen werden bereits seit 1970 bei Zahnimplantaten und seit 1985 bei Hüftgelenkendoprothesen eingesetzt. Das Ziel der Beschichtungen besteht in einer Verkürzung der postoperativen Entlastungsphase des Patienten und letztendlich in einer direkten Lasteinleitung vom Implantat in den Knochen (86). Der bioaktive Effekt dieses Calciumphosphats bringt folgende Vorteile mit sich:

- Es findet keine Abkapselung des Implantats durch ein Bindegewebe statt, sodass der Knochen direkt an das Implantat heranwachsen kann.
- Durch diese schnelle Osteointegration ergibt sich eine kürzere Heilungsphase als bei metallischen Oberflächen, was kürzere Liegezeiten für den Patienten zur Folge hat.
- Zwischen Schicht und Substrat bildet sich eine Verbindung aus, welche neben Druck- und Scherkräften auch Zugkräfte aufnehmen kann.
- Eine Ionenfreisetzung von Elementen der metallischen Substratwerkstoffe wird reduziert.
- Eine beschleunigte Überbrückung von Lücken an der Implantat/Knochen Grenze.
- Bei Patienten, die an Osteoporose erkrankt sind, wurde eine spezielle Eignung festgestellt.
- Eine höhere Toleranz bei Mikrobewegungen.

Jedoch bringt diese Beschichtung auch Nachteile mit sich:

- Während des Beschichtungsprozesses findet ein Kristallinitätsverlust statt. Dieser verursacht eine Zunahme der Löslichkeit. Daraus ergibt sich eine örtlich unterschiedliche Löslichkeit und auch der Auflösungsgrad ist nicht vorhersagbar.
- Die Spritztechnologie bedingt Veränderungen in der Zusammensetzung und Kristallinität.
- Die Spritztechnologie bringt eine ungleichmäßige Beschichtung mit sich.
- Die Spritztechnologie bewirkt eine hohe Lagendicke, üblicherweise mehr als 30µm.

## Literaturübersicht

- Während des Beschichtungsprozesses kommt es zu einer thermischen Zerlegung des HA Pulvers, wodurch die Beschichtung abblättern und möglicherweise einen Verschleiß auf den berührenden Gelenkoberflächen verursachen könnte.
- Die Festigkeit der HA/Titan Grenzschicht könnte infolge der funktionellen Belastung abnehmen und sich auf längere Sicht von seiner Grundlage abtrennen.
- Es gibt einen „line of sight process“, der für poröse Oberflächen und komplizierte Implantatformen ungeeignet ist.

Gemäß den Angaben von Mockwitz (79) wurde eine direkte knöcherne Integration von zementfreien Implantatschäften ohne bindegewebige Zwischenschichten erst durch die Oberflächenbeschichtung mit HA erreicht. Allerdings mit einer Schaftlockerungsrate von 9,2% nach nur 6 Jahren. Trotzdem erschienen mittelfristige Ergebnisse mit HA beschichteten Prothesen vielversprechend und es erscheint möglich, dass derartige Beschichtungen nach 10 Jahren Verlaufsbeobachtung dem zementierten Standard zumindest ebenbürtig sein können (15).

Gondolph-Zink (41) untersuchte in einer Kaninchenstudie, ob die bioaktive HA Beschichtung gegenüber biotoleranten und bionierten Werkstoffen bezüglich der Osteointegration tatsächlich im Vorteil ist. Dazu wurden insgesamt 90 Tieren für 4, 8 und 12 Wochen Implantate aus Kobald-Chrom-Nickel, Titan oder HA beschichtetem Titan eingebracht und jeweils unbelastete und belastete Gruppen gebildet. Die Haftfestigkeit war bei allen entlasteten Proben signifikant höher. Eine Osteointegration konnte bei den drei unterschiedlichen Implantaten, sowohl in den belasteten als auch in den entlasteten Serien nachgewiesen werden. In den belasteten Proben zeigten sich die Titan und HA beschichteten Titan Implantate jedoch gleichwertig den Kobald-Chrom-Nickel Implantaten weit überlegen. Die gesteigerte Osteointegration der HA beschichteten Implantate ist allerdings nicht mit einer höheren Haftfestigkeit der Implantate gleichzusetzen.

In einer groß angelegten Studie, die den Knochenumbau um HA beschichtete Oberschenkelstiele röntgenologisch untersuchte, wurden 224 Hüftgelenksprothesen implantiert. Das proximale Drittel des Stiels war mit einer 50µm dicken Lage HA beschichtet und die Dauer der Nachuntersuchung lag bei etwa 6 Jahren. Eine frühe, umfassende proximale Fixation des Implantats mit distaler Lastübertragung durch das Implantat konnte nachgewiesen werden. Die röntgenologischen Ergebnisse einer fortschreitenden Knochenneubildung des Femur um den

## Literaturübersicht

mittleren und distalen Anteil des Stieles lieferten dafür den Beweis. Zudem stimmen die röntgenologischen Ergebnisse mit den guten klinischen Ergebnissen überein (25).

Chang et al. (17) untersuchten in einem Hundemodell den Einfluss von HA beschichteten Implantaten unterschiedlicher Kristallinität (50%, 70%, 90%) auf die Osteointegration. Sie fanden heraus, dass die Kristallinität der HA Beschichtung keinen signifikanten Einfluss auf die Knochenbildung und Knochenbindungskraft hat. Eine hohe Kristallinität sei jedoch wünschenswert, im Hinblick auf Beständigkeit und die Aufrechterhaltung der knochenleitenden Möglichkeiten.

Overgaard et al. (88) kamen in ihrer Hundestudie mit der gleichen Fragestellung zu einem abweichenden Ergebnis. Die HA beschichteten Implantate deren Kristallinität bei 50% lag, waren denen mit 75% im Hinblick auf eine frühe mechanische Fixation, die Menge des eingewachsenen Knochens und die Menge der resorbierten Beschichtung deutlich überlegen. Dabei fanden sie eine initiale Phase, die mit einer schnellen Resorption der Beschichtung einherging und eine zweite langsamere Phase. Die resorbierte HA Beschichtung wurde teilweise durch einwachsenden Knochen ersetzt, was eine dauerhafte Implantatfixation vermuten lässt.

Hara et al. (46) untersuchten die Wirkung einer HA Beschichtung im Vergleich zu unbeschichteten Titan-Implantaten, indem sie jeweils 15 ovariectomierten Ratten und 15 shamoperierten Ratten 24 Wochen nach diesem Eingriff ein HA beschichtetes Implantat in den rechten und ein unbeschichtetes Implantat in den linken Femur einbrachten. Nach 4 Wochen wurden die Tiere getötet und push-out Tests, Histologien sowie Knochenmineraldichtemessungen durchgeführt. Die Haftfestigkeit der HA beschichteten Implantate war in beiden Gruppen höher als die der unbeschichteten Implantate ( $p < 0,0001$ ), wobei die HA beschichteten Implantate der ovariectomierten Gruppe eine Abnahme der Haftfestigkeit von 40,3% im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten ( $p < 0,0001$ ). Durch die Ovariectomie war die trabekuläre Knochendichte dieser Tiere gegenüber der der Kontrolltiere vermindert. Die HA beschichteten Implantate waren, im Gegensatz zu den unbeschichteten Implantaten, in beiden Gruppen vollständig mit neuem, fest verbundenem Knochen umgeben. Die per DXA gemessene Knochenmineraldichte der linken Tibiae unterschied sich bei den Kontrolltieren und den ovariectomierten Tieren um  $35,01 \text{ mg/cm}^2$ . Hara folgerte aus diesen Ergebnissen, dass HA beschichtete Implantate die Fixation einer zementfreien Hüftgelenkprothese verbessern können, die Präsenz einer Osteoporose diesen Vorteil jedoch einschränken könnte.

## Literaturübersicht

Auch Motohashi et al. (82) und Pan et al. (89) haben in ihren Studien an Ratten die Auswirkungen einer Osteoporose auf den Knochenumbau bei HA beschichteten Implantaten untersucht. Obwohl sich die Studien dahingehend unterschieden, dass bei Motohashi zuerst ovariectomiert wurde und danach die Implantate eingebracht wurden, und bei Pan zuerst implantiert und anschließend ovariectomiert wurde, kamen doch beide Versuche zu dem gleichen Ergebnis: Im Bereich der Kortikalis bewirkte die Ovariectomie weder einen Unterschied des Knochenvolumens um das Implantat, noch einen Unterschied des Knochen/Implantat Kontaktes im Vergleich mit den sham-operierten Ratten. Im Bereich des trabekulären Knochens jedoch zeigte sich bei den ovariectomierten Tieren eine signifikante Abnahme, sowohl des Knochenvolumens um das Implantat, als auch ein verminderter Kontakt des Implantates zu dem neu gebildeten Knochen.

Das Tiermodell von Søballe et al. (117) zeigte ebenfalls, dass HA Beschichtungen im Fall von Osteoporose und Knochenverpflanzungen nützlich waren.

Die Vorteile einer bioaktiven CaP Beschichtung in der frühen Phase nach der Einsetzung des Implantats, mit gleichzeitiger Vermeidung der Nachteile von plasmagespritzten HA Beschichtungen und deren möglichen Langzeitrisiken, führten zu der Entwicklung der 2. Generation von bioaktiven CaP Beschichtungen. Zu dieser Generation gehört Bonit<sup>®</sup> (120, 133).

### 2.4.7. Material

Jedes Implantatmaterial induziert im menschlichen Organismus eine Reaktion. Diese kann sowohl erwünscht (z.B. Osteointegration), als auch unerwünscht (z.B. Entzündung) sein. Man spricht dann von positiver bzw. negativer Bioaktivität. Die verwendeten Materialien lassen sich in Abhängigkeit von ihrer Wechselwirkung mit der physiologischen Umgebung prinzipiell in die Klassen biotolerant, bioinert und bioaktiv einteilen. Biotolerante Materialien, wie bspw. Co-Cr-Stahl, zeigen eine Distanzosteogenese mit bindegewebiger Abkapselung, die in vielen Fällen zu einer Lockerung des Implantats führt. Bioinerte Materialien zeigen eine Kontaktosteogenese, das heißt, es entsteht ein direkter Kontakt zwischen dem Implantat (z.B. Titan) und dem Knochen, wobei das Knochenwachstum in Richtung der Implantatoberfläche erfolgt. Eine optimale Reaktion zwischen Implantat und dem umliegenden Knochen, sowie die angestrebte verbesserte Einwachskinetik, welche insbesondere zu einer wesentlich verkürzten Heilungsphase führt, wird durch die Verbundosteogenese erzielt. Dieses Wechsel-

wirkungsverhalten zwischen Implantat und Knochen wird vor allem von bioaktiven Materialien (z.B. Hydroxylapatit) erreicht. Die Knochenneubildung beginnt hierbei an der Implantatoberfläche, das Wachstum (osteokonduktiv oder osteoinduktiv) ist stets zum Empfänger-gewebe gerichtet. Eine möglichst schnelle biologische Fixierung von künstlichen Knochen-implantaten, sowie die Realisierung einer gewünschten Einwachskinetik am Implantationsort, kann insbesondere durch die Verwendung von bioaktiven Calcium-Phosphat-Beschichtungen, die eine Apatitphase enthalten, gewährleistet werden (49).

### 2.4.8. Verträglichkeit und Komplikationen

Reaktionen an den Grenzflächen von Implantaten zum umgebenden Gewebe entscheiden über Erfolg oder Misserfolg einer chirurgischen Behandlung in der Orthopädie. Ein lasttragendes Implantat, in dessen Umgebung Prozesse ablaufen, die mit einer Knochenresorption einhergehen, wird im weiteren Heilungsverlauf auslockern und kann die Kraftübertragung im Falle einer Fraktur nicht mehr gewährleisten, mit der Konsequenz einer Pseudarthrose oder Prothesenlockerung. Besonders in Knochen, deren mechanische Kompetenz durch andere Vorerkrankungen wie Osteoporose reduziert ist, wird die Frakturfixation problematisch. Die lokalen Gewebsreaktionen an Grenzflächen zu Implantaten werden von implantatspezifischen, operationstechnischen und organismuseigenen Faktoren entscheidend beeinflusst. Der durch das Implantat und den dafür notwendigen Zugang hervorgerufene, initiale Durchblutungsschaden, bestimmt die Ausgangsbedingungen für eine spätere Osteointegration. Lokale wie systemische Reaktionen auf eingebrachte Implantate werden unter anderem von entstehendem Abrieb bestimmt. Dieses Phänomen wird für die begrenzte Lebensdauer von Prothesen, sowie für einige Implantatversager in der Frakturbehandlung verantwortlich gemacht. Nicht nur das Material der Abriebpartikel, sondern auch deren Größe haben einen entscheidenden Einfluss auf die körpereigene Immunantwort (40). Es wird vermutet, dass Partikel unter 100nm pinozytiert werden, während größere Partikel von Fresszellen phagozytiert werden. Die kleineren Partikel können dadurch über das Immunsystem bis hin zur Leber, Lunge und Milz transportiert werden und verursachen in den Zielorganen Zellreaktionen, die von ihrer Zytotoxizität abhängen, größere Partikel führen dagegen zu lokalen Gewebsreaktionen (39).

Obwohl die klinischen Resultate von Endoprothesen in der Regel sehr gut sind, entwickeln einige Implantate Lockerungen und bedürfen einer Revision. Dieses Implantatversagen ist auf

eine Reihe von Gründen zurückzuführen. Die Hauptursache wird dabei maßgeblich von der jeweiligen Implantationsart und dem Implantatdesign bestimmt (8).

### 2.4.8.1. Infektion

Infektionen sind für das Versagen von etwa 1-5% aller Fälle von primär implantierten Endoprothesen verantwortlich. Sie kommen jedoch vorwiegend nach Revisionseingriffen vor und häufiger bei Kniegelenk- als bei Hüftgelenkendoprothesen. Die Risiken einer Infektion sind vielfältig und umfassen mitunter die Operation an sich und die Qualität des Knochens. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass sich Bakterien leicht an die meisten Materialien, die in der Endoprothetik verwendet werden, binden. Dazu gehören Titan, Kobalt-Chrom, rostfreier Stahl und Polymethylmethacrylat (PMMA). Die Diagnose wird gestellt aufgrund einer Kombination von klinischen Merkmalen, röntgenologischen Befunden und Labortestergebnissen (8).

### 2.4.8.2. Osteolyse

Aseptische Lockerungen und periprotetische Osteolysen sind gegenwärtig die häufigsten Gründe für das Versagen von Endoprothesen. Abriebpartikel der in der Endoprothetik verwendeten Materialien gelten als Hauptursache für das Auftreten von periprotetischen Osteolysen. Milliarden von kleinsten Abriebpartikeln des Ultra High Molecular Weight Polyethylen (UHMWPE) aus dem acetabulären Anteil einer Endoprothese werden als die Schlüsselsubstanz angesehen. Makrophagen versuchen die anfallenden Partikel zu beseitigen. Dabei setzen sie lysosomale Enzyme und Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandin E, Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor und Interleukin-6, frei. Über eine durch diese Mediatoren vermittelte Aktivierung der Osteoklasten wird der periprotetische Knochen resorbiert und die Entstehung von Osteolysen induziert. Da mit dem Abbau des Knochens die Verankerung des Implantats geschwächt wird, resultiert eine Lockerung und damit das Versagen des Implantats. Dadurch bedingte Revisionseingriffe bringen wiederum eine hohe Rate an lokalen und systemischen Problemen sowie enorme Kosten mit sich (Kurth aus (60) S. 125-126, 8, 111).

### 2.4.8.3. Osteopenie

Die Bedeutung von mechanischer Belastung auf das Knochenvolumen ist bekannt, seit Wolff nachdrücklich auf die Veränderungen der strukturellen Eigenschaften des Knochens unter mechanischem Stress hinwies. Durch die Implantation von Endoprothesen wird die einwirkende Kraft und die Krafrichtung auf den Knochen maßgeblich verändert. So verändert jede in den medullären Kanal des Femur eingebrachte Prothese die Kraftverteilung. Die proximale Kortikalis und der trabekuläre Knochen werden einer geringeren Belastung ausgesetzt. Die Kraft wird durch den mittleren und distalen Anteil des Schaftes auf die Kortikalis der Diaphyse geleitet. Somit wird der proximale Knochen durch das Implantat entlastet (stress shielding) und entsprechend dem Wolff'schen Gesetz abgebaut. Engh et al. fanden mit Hilfe von DXA-Messungen heraus, dass der Knochenverlust im proximalen Femur bis zu 52% betragen kann. Allerdings scheint sich diese periprothetische Osteopenie nach ungefähr 2 Jahren zu stabilisieren (8, Kurth aus (60) S. 126-127).

### 2.4.8.4. Ermüdungsversagen

Wiederholte Belastung kann eine mechanische Zerstörung des Prothesenmaterials oder der Grenzschicht zwischen Implantat und Knochen verursachen. Der Knochen ist zwar in der Lage, sich innerhalb bestimmter Grenzen neu zu bilden, aber die Anhäufung einer mechanischen Zerstörung an der Implantatoberfläche kann die Implantat/Knochen Bindung zerreißen, woraus Mikrobewegungen entstehen. Die Lockerung von zementierten Prothesen liegt häufig darin begründet. Aber auch bei Implantaten, die durch eine knochenleitende Oberflächenbeschichtung ihre Stabilität erlangen, spielt dieses Ermüdungsversagen eine Rolle. Relativ dünne HA Beschichtungen scheinen für die Endoprothetik gut geeignet zu sein, da sie im Femur keine klinisch relevante Ablösung oder Ermüdungsversagen zeigen. Experimentelle Untersuchungen mit HA Beschichtungen von ca. 50µm Dicke, die einer wiederholten mechanischen Belastung unterzogen wurden, versagten eher infolge einer Fraktur innerhalb des trabekulären Knochens, als durch ein Versagen an der Knochen/HA Grenzschicht bzw. der HA/Implantat Grenzschicht. Untersuchungen von HA Beschichtungen, die dicker als 100µm waren, wiesen jedoch ein Ermüdungsversagen innerhalb der Beschichtung auf, sodass die meisten Hersteller HA Beschichtungen mit einer maximalen Dicke von 60µm produzieren (8).

### 2.4.8.5. Implantatbewegung

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass auch eine Implantatbewegung allein, ohne Beteiligung von Verschleißteilchen, mit einer Knochenresorption in Verbindung stehen kann. Die zellulären Mechanismen, durch die eine ausgedehnte Implantatbewegung die Knochenresorption induzieren könnte, sind jedoch nicht bekannt. Endoprothesen, die keine angemessene primäre Stabilität erlangen, werden infolge der Belastung eine Mikrobewegung zeigen. Diese Bewegung allein erklärt möglicherweise das Versagen von vielen Endoprothesen (8).

### 2.4.8.6. Erhöhter Flüssigkeitsdruck

Auch ein erhöhter Flüssigkeitsdruck um die Implantate kann zur Entstehung einer periprothetischen Knochenresorption beitragen. Möglicherweise erzeugen Mikrobewegungen des Implantates beim Gehen diesen erhöhten Flüssigkeitsdruck, wodurch der Druck im Gelenk in den Knochen weitergeleitet wird, da die Gelenkkapsel -als unvermeidbare Konsequenz der Implantation- beschädigt wurde (8).

### 2.4.9. Einsatz von Bisphosphonaten in der Endoprothetik

Aufgrund ihres inhibitorischen Effekts auf die Osteoklasten sind Bisphosphonate hervorragend geeignet, um abriebvermittelte Osteolysen sowie die periprothetische Osteopenie zu behandeln, da die Effektorzelle dieser Prozesse ebenfalls der Osteoklast ist (Kurth aus (60) S. 125-134).

Millett et al. (76) erforschten die Auswirkungen von Alendronat auf eine abriebvermittelte Osteolyse in einem Rattenmodell. Hierzu wurden Entzündungsreaktionen auf Polyethylenpartikel mit Osteolysen um Implantate erzeugt. Von Alendronat war bekannt, dass es in der Lage ist, eine Knochenresorption durch Osteoklasten zu blockieren. Durch den therapeutischen Einsatz von Alendronat in dieser Studie wurde aber auch dem Fortschreiten der abriebvermittelten periprothetischen Osteolyse vorgebeugt.

Shanbhag et al. (112, 111) implantierten 24 Hunden, die in 3 experimentelle Gruppen unterteilt wurden, eine zementfreie Hüftgelenksprothese aus Titan. Zwei Gruppen wurde intraoperativ ein Gemisch aus Abriebpartikeln, bestehend aus Polyethylen, Titan und Kobald-Chrom in eine Einkerbung proximal am Femur eingebracht. Eine dieser beiden Gruppen

## Literaturübersicht

erhielt zusätzlich ab dem 7. Tag nach dem Eingriff täglich oral 5mg Alendronat. Die Tiere durften sich 24 Wochen frei bewegen und wurden dann euthanasiert. Röntgenologisch zeigte sich bei einem Tier aus der Kontrollgruppe eine periprothetische Saumbildung. Aus der Gruppe mit den Abriebpartikeln entwickelten 6 von 7 Tieren periprothetische Osteolysen. In der mit Alendronat behandelten Gruppe wies hingegen nur ein Tier eine Randsaumbildung auf. Allerdings wurde im Gewebe der beiden mit Abriebpartikeln versehenen Gruppen eine signifikante Makrophageninfiltration festgestellt und eine biochemische Analyse erbrachte deutlich erhöhte Spiegel von Prostaglandin E2 und Interleukin-1. Dennoch beweist dieser Versuch, dass Bisphosphonate in der Lage sind, periprothetische Osteolysen zu verhindern.

Weil die Hemmung der Knochenresorption durch Alendronat das empfindliche Gleichgewicht zwischen Abbau und Aufbau im normalen Knochenumbau zerstören kann, untersuchten Wang et al. (127) die Wirkung von Alendronat auf die biomechanischen Eigenschaften von gesundem Knochen. Dafür implantierten sie 16 Hunden künstliche Hüftgelenke, von denen 8 Tiere zusätzlich Abriebpartikel in eine Einkerbung des Femurschaftes und täglich oral 6mg Alendronat über einen Zeitraum von 23 Wochen erhielten. Bei dieser Kurzzeittherapie wurden weder die Frakturheilung, noch die Mineralisation, noch die biomechanischen Eigenschaften des Kallus bzw. des neu gebildeten Knochens negativ beeinflusst.

Eine interessante therapeutische Strategie zur Vorbeugung bzw. Kontrolle einer durch aseptische Lockerung verursachten Osteolyse liefert die Studie von Sabokbar et al. (108). In Monozytenkokulturen auf humanen Knochenproben konnte durch eine Mischung von Etidronat mit Knochenzement die PMMA Partikel induzierte Makrophagen-Osteoklasten-Differenzierung und eine Knochenresorption unterbunden werden.

Auch in der Therapie der stress-shielding vermittelten Knochenresorption können Bisphosphonate erfolgreich eingesetzt werden. Das zeigte die Hundestudie von Bragdon et al. (13), in der 12 Wochen nach der Implantation einer Totalendoprothese durch die orale Applikation von Alendronat eine signifikante Abnahme des Knochenverlustes erreicht wurde.

Shanbhag (111) berichtet von einer experimentellen Studie, die von Goodship et al. durchgeführt wurde, wonach Schafen Implantate in den Femur eingebracht wurden und 16 Wochen später in der Kalkarregion und der medialen Kortikalis eine signifikante Osteopenie, bedingt durch stress-shielding, auftrat. Eine intravenöse Infusion von 10µg Zoledronat einen Monat vor, während und einmal monatlich nach der Operation, reduzierten diesen Knochenverlust.

## Literaturübersicht

Durch den Einsatz von Bisphosphonaten ergeben sich auch Hinweise auf eine verbesserte Osteointegration von Implantaten. Es ist anzunehmen, dass durch die Gabe von Bisphosphonaten, mit der nachfolgenden Hemmung der Osteoklasten und einer eventuellen Aktivierung der Osteoblasten, der periprothetische Knochen schneller das Implantat integriert. So könnte eine schnellere ossäre Endoprothesenintegration und somit eine frühere Belastbarkeit erreicht werden (Kurth aus (60) S.125-134).

Trotz der zahlreichen guten Ergebnisse, die in der Therapie periprothetischer Knochenresorptionen mit Bisphosphonaten erzielt wurden, gibt es auch Studien, die diesen positiven Effekt nicht bestätigen. So stellten Astrand und Aspenberg (4) fest, dass Alendronat die instabilitätsvermittelte Knochenresorption in ihrem Rattenversuch nicht zu hemmen vermochte. Die Knochendichte der behandelten Tiere nahm zwar zu, sodass ein systemischer Effekt von Alendronat auf die Osteoklasten nachgewiesen werden konnte, aber die osteoblastische Knochenformation war verringert, was schließlich die Knochenresorption verursachte.

Mochida et al. (78) implantierten 12 Hunden beidseitig Hüftgelenke, deren Oberschenkelstiele mit HA beschichtet waren. 6 der Tiere erhielten oral Alendronat und alle Tiere wurden 4 Wochen nach dem Einsetzen des zweiten Hüftgelenks getötet. Weder die röntgenologische noch die histologische Auswertung wiesen einen bedeutsamen Einfluss von Alendronat auf den Umfang der Knochenapposition, die Dicke der HA Beschichtung noch den kortikalen bzw. trabekulären Knochenbereich um die Implantate nach.

Alendronat (Fosamax<sup>®</sup>) wird häufig zur Therapie an Osteoporose erkrankten Frauen eingesetzt, weil es eine Reduktion des Knochenabbaus bewirkt, die Knochendichte ansteigen lässt und die Frakturhäufigkeit senkt. Da die Zahl der mit Alendronat behandelten Frauen, die sich einer Hüftgelenksoperation unterziehen müssen, steigt, war es das Ziel der Studie von Frenkel et al. (34), die Wirkung von Alendronat auf die Knochenneubildung und die Bindung an die Implantatoberfläche in einem normalen und einem simulierten östrogen- und calciumdefizienten Hundemodell mit Hilfe von implantierbaren Knochenwachskammern zu testen. Die Ergebnisse zeigten keine erkennbare Wirkung auf das Knochenwachstum oder die Bindungskraft an die verschiedenen Oberflächen der zementfrei eingebrachten Implantate während der ersten 6 Monate. Da eine frühe Osteointegration entscheidend für die Langlebigkeit eines Implantats ist, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass Empfänger von Endoprothesen sich zwar einer Alendronat-Therapie unterziehen können, die Kurzzeitwirkung vom Empfängerewebe auf das Implantat jedoch ausbleibt.

## 2.5. Tiermodelle in der Osteoporoseforschung

Ein Tiermodell für den postmenopausalen Knochenverlust kann definiert werden als ein lebendes Tier, in dem spontaner oder induzierter Knochenverlust, der auf ein ovarielles Hormondefizit zurückzuführen ist, untersucht werden kann und in dem die Charakteristika des Knochenverlustes und deren Folgen denen ähneln, die bei postmenopausalen Frauen in einer oder mehr Hinsicht, gefunden werden (56).

In der Erforschung der postmenopausalen Osteoporose ist das gebräuchlichste und wohl auch das am besten geeignete Tiermodell das der ovariectomierten Ratte. Zahlreiche Untersuchungen sind vor allem in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Osteopenie ovariectomierter Ratten mit der postmenopausalen Osteoporose durchgeführt worden. Dabei wurde festgestellt, dass der durch die Ovariectomie induzierte Knochenverlust der Ratte in vielen Punkten den Folgen des Knochenverlustes im menschlichen Klimakterium gleicht (56).

So kommt es sowohl bei der Frau als auch bei der Ratte unter Östrogenmangel zu einem erhöhten Knochenumbau, wobei die Knochenresorption die -neubildung übertrifft. Sowohl die Menopause als auch die Ovariectomie verursachen anfänglich eine schnelle Phase des Knochenverlustes, die mit dem maximalen Anstieg im Knochenumbau zusammenfällt, und später eine wesentlich langsamere Phase. Beiden Spezies gemein ist ebenfalls die Tatsache, dass der Knochenverlust in der Spongiosa größer ist als in der Kortikalis und dass dieser Knochenverlust in den Wirbelknochen stärker hervortritt als in den langen Röhrenknochen (132). Auch vergleichende Studien von Serum- und Harnparametern bestätigen, dass die Veränderungen, die bei Mensch und Tier durch den Östrogenmangel hervorgerufen werden, Parallelen aufweisen. Die intestinale Calciumabsorption ist vermindert und Fettleibigkeit scheint eine schützende Wirkung gegen den hormonell bedingten Knochenverlust zu bieten (56). Postmenopausale Knochentherapeutika, insbesondere Bisphosphonate, wirken auch bei ovariectomierten Ratten knochenprotektiv (31).

Trotz dieser Übereinstimmungen blieben zunächst Zweifel, die ovariectomierte Ratte als Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose einzusetzen. Zum einen bleibt die Skelettmasse von Ratten - im Gegensatz zu der des Menschen - über einen längeren Zeitraum ihrer Lebensspanne hinweg stabil. Allerdings kann durch die Ovariectomie und das daraus resultierende Östrogendefizit der beschleunigte Knochenverlust stimuliert werden, wodurch der Zustand von Frauen in der Menopause nachgestellt wird (56). Zum anderen wurde mittlerweile nachgewiesen, dass das Rattenskelett nicht lebenslang kontinuierlich wächst,

wodurch das Tiermodell Ratte nicht geeignet wäre zur Erforschung einer Krankheit wie der postmenopausalen Osteoporose, die erst nach dem Erreichen der Skelettreife beginnt (37). Li et al. (66) konnten zeigen, dass das Längenwachstum der proximalen Tibia von weiblichen Sprague-Dawley Ratten bis zu einem Alter von 6 Monaten schnell ansteigt, sich dann verringert, um im Alter von 12 Monaten unbedeutend zu werden und schließlich mit 18 Monaten infolge Verknöcherung der Epiphysenfugen vollständig beendet ist. Mit 8 Monaten konnten sie ein Längenwachstum in den Lendenwirbelknochen kaum noch entdecken. Für Studienzwecke sollte daher unterschieden werden nach „aged rat model“, wobei es sich um 6-24 Monate alte Tiere mit ausgereiftem Skelettsystem handelt, und „mature rat model“, wobei es sich um 3-6 Monate alte Tiere mit nahezu ausgereiftem Skelettsystem handelt (56). Schließlich widerrief Frost (37) die von ihm selbst 1976 veröffentlichte Meinung, dass Ratten kein intrakortikales Remodeling besäßen und ihr Knochenstoffwechsel lebenslang von der Modeling-Aktivität beherrscht werde. Da die Ursache des postmenopausalen Knochenverlustes in einem Defekt dieser Umbauaktivitäten liegen könnte, war diese Frage von entscheidender Bedeutung. Tatsächlich ist das Havers-System-Remodeling bei jungen Ratten (<8 Monate) nur wenig ausgeprägt, aber bei älteren Tieren wird der trabekuläre Knochen ebenso wie beim Menschen durch Remodeling unter fortlaufender Erneuerung konserviert. Durch eine Ovariectomie oder „low-Ca-diet“ lässt sich das intrakortikale Remodeling zudem verstärken.

Eine Einschränkung für das Tiermodell Ratte besteht jedoch in der Entstehung einer Osteoporoseerkrankung. Ovariectomierte Ratten entwickeln eine deutliche Osteopenie, lassen aber keine Beeinträchtigung des Bewegungsapparates erkennen. Eine erhöhte Knochenbrüchigkeit mit Spontanfrakturen, die als Markenzeichen der menschlichen Osteoporose gilt, konnte bislang nicht festgestellt werden. Allerdings wurden bisher auch bei keiner größeren Tierart Frakturen nachgewiesen (37).

Aufgrund einer Zyklusdauer von vier bis fünf Tagen reagiert die weibliche Ratte viel schneller auf hormonale Veränderungen als bspw. saisonalöstrische oder diöstrische Tiere wie der Hund. Somit bietet die Ratte einen großen Vorteil gegenüber anderen Tiermodellen in der Osteoporoseforschung, da sich Effekte auf den Knochen in kürzerer Zeit darstellen lassen. Der Zeitraum zwischen Ovariectomie und Ausbildung einer massiven Osteopenie beträgt durchschnittlich 10-12 Wochen.

Aktuell wird die ovariectomierte Ratte aufgrund zuvor genannter Gemeinsamkeiten mit der postmenopausalen Frau, sowohl von der WHO als auch der FDA als Tiermodell empfohlen, um die durch Östrogenmangel bedingte Osteopenie zu untersuchen (131, 123, 75).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 85 sechs Monate alte weibliche Sprague Dawley Ratten (Firma Harlan Winkelmann, Borcheln), deren durchschnittliches Körpergewicht 300g betrug. Sprague Dawleys gehören zur Gruppe der Albinos. Es sind ruhige, intelligente und freundliche Tiere, deren Lebenserwartung bei 2-3 Jahren liegt. Im Alter von 6-8 Wochen kommen sie in die Pubertät, vermehren sich aber erst mit 3 Monaten (51).

Die Tierhaltung erfolgte in der zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität. Die Ratten waren in mit Holzspänen ausgestreuten Makrolonkäfigen aus Polykarbonat der Größe 550 x 330 x 200mm (L/B/H) in 3er oder 4er Gruppen untergebracht. Die Raumtemperatur lag bei 22°C und die Luftfeuchtigkeit bei 45%. Es gab ein automatisch gesteuertes, künstliches Lichtprogramm im Tag-Nacht-Rhythmus von 12/12h. Die Tiere erhielten in rationierter Fütterung Pellets der Firma Ssniff (Haltungsfutter für Ratten; Diät) mit folgenden Inhaltsstoffen: 19% Rohprotein, 3,3% Fett, 4,9% Rohfaser, 6,7% Rohasche, 1,0% Calcium, 0,7% Phosphor, 0,25% Natrium, 0,2% Magnesium, 0,9% Kalium, Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen. Leitungswasser aus Nippelflaschen stand ad libitum zur Verfügung.

Die Tiere wurden nach den gesetzlichen Vorgaben gehalten und die Studie wurde mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Darmstadt (Aktenzeichen F119/Anz.01) und der Tierschutzkommission des Klinikums durchgeführt.

#### 3.2. Die Osteoporose

Voraussetzung für die Durchführung der Studie war ein bereits bestehender Knochenmassenverlust der Tiere. Dieser wurde durch einen operativen Eingriff des Lieferanten wenige Tage vor der Lieferung provoziert. Die mit Ketamin und Xylazin anästhesierten Tiere wurden hierfür in Bauchlage gebracht und im Lendenbereich geschoren und desinfiziert. In der

Hälfte, zwischen der Mitte des Tieres und dem Schwanzansatz, erfolgte ein 2-3cm langer Hautschnitt. Mit einem weiteren ca. 10mm großen Schnitt, wurde die darunter liegende Muskulatur der seitlichen Bauchwand durchtrennt und durch das stumpfe Spreizen mit einer spitzen, anatomischen Pinzette eine Öffnung zur Bauchhöhle präpariert. Die Gonaden, die in einem Fettpolster direkt unter der Muskulatur lokalisiert sind, wurden mit einer weiteren Pinzette vorsichtig nach außen gezogen und das Ovar, sowie ein Teil des Ovidukts, mit einem Schnitt durch das Ovidukt nahe dem Ovar abgetrennt. Das restliche Fettgewebe wurde in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Hautwunde mit 3-4 Wundverschlussklammern adaptiert. Anschließend erfolgte der gleiche Eingriff auf der anderen Körperseite. Bei den scheinoperierten Tieren wurden die Ovarien nur vorgelagert und dann wieder in die Bauchhöhle verbracht. Durch diese sogenannte Scheinoperation wurden Begleitfaktoren einer Operation, wie Narkosestress und Wundschmerz, welche sich auf die Knochenmineraldichte auswirken könnten, in allen Versuchsgruppen gleichermaßen verursacht (94). Von den insgesamt 85 Tieren wurden 65 ovariectomiert und 20 scheinoperiert. Um die Ausbildung der Osteoporose bei den ovariectomierten Tieren abzuwarten, verblieben sie vom Tag ihrer Anlieferung bis zum Versuchsbeginn für 13 Wochen in der ZFE.

### 3.3. Die Implantate

Als Implantate wurden Hydroxylapatit beschichtete Titanstifte mit einem Durchmesser von 0,96mm verwendet.

Die ursprünglichen Titanstifte wurden von der Firma Stryker-Osteo in Mühlheim an der Ruhr bezogen und dann an die Firma Ceram Tec AG in Plochingen weiter geschickt, wo sie mit Biolog osprovit beschichtet wurden.

### 3.4. Die Testsubstanz Ibandronat

Ibandronat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) trägt die firmeninterne Bezeichnung BM 21.0955 und die chemische Bezeichnung 3-(N-Methyl-N-Pentyl)amino-1-Hydroxypropan-1,1-Bisphosphonsäure. Es liegt als Mononatriumsalz und Monohydrat vor. Die chemische Formel lautet  $C_9H_{22}NO_7P_2Na_xH_2O$ . Das Molekulargewicht beträgt 359,24g (9).

Bei der Zubereitung von Ibandronat für die experimentellen Gruppen standen Stammlösungen von 5,6mg Ibandronat auf 100ml NaCl und 14,1mg Ibandronat auf 10ml NaCl zur Verfügung. Um das Injektionsvolumen möglichst gering zu halten, wurden diese Stammlösungen 3-fach konzentriert, woraus 16,8mg Ibandronat auf 100ml NaCl und 42,3mg Ibandronat auf 10ml NaCl resultierten. Als Injektionslösungen ergaben sich daher jeweils 5ml Stammlösung auf 495ml NaCl. Als Applikationsvolumen wurden 2ml/Kg KGW festgelegt. Diese Menge basiert auf den Ergebnissen einer Pilotstudie dieser Studienreihe. Aufgrund der 3-fachen Konzentration mussten diese 2ml durch 3 geteilt werden, sodass die tatsächlich zu applizierende Dosis bei 0,66ml Ibandronat pro Kg KGW lag.

### 3.5. Versuchsplan

#### 3.5.1. DXA-Messung

Um die Ausbildung der Osteoporose bei den ovariectomierten Tieren zu überprüfen, und um den Status der Knochenmineraldichte vor und nach der Therapie bei jedem einzelnen Tier miteinander vergleichen zu können, wurde vor Therapiebeginn eine DXA-Messung vorgenommen.

Hierfür wurden die Tiere gewogen und aufgrund des Gewichtes auf die Narkosemenge geschlossen. Die Anästhesie erfolgte mit einer Mischspritze aus Ketamin in einer Dosierung von 75mg/kg (Ketanest<sup>®</sup>, 0,75ml/kg) und Xylazin in einer Dosierung von 5mg/kg (Rompun<sup>®</sup>, 2%ige Lösung, 0,25ml/kg) intraperitoneal.

3.5.2. Einteilung der experimentellen Gruppen

Die Studie umfasste insgesamt 4 experimentelle Gruppen.

Die 1. experimentelle Gruppe (=Kontrollgruppe) bestand aus den 20 schein-operierten Tieren. Diese erhielten täglich eine subcutane Applikation von 0,9%igem NaCl über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Die Zuordnung zur 2. experimentellen Gruppe richtete sich nach den ermittelten DXA-Werten. Dementsprechend wurden die 24 Tiere mit der geringsten Knochendichte dieser Gruppe zugeordnet. Auch sie erhielten täglich eine subcutane Applikation von 0,9%igem NaCl über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Die verbliebenen ovariectomierten Tiere wurden randomisiert der 3. und 4. experimentellen Gruppe zugeteilt. Die 20 Tiere der 3. experimentellen Gruppe erhielten täglich eine subcutane Applikation von Ibandronat (Stammlösung I), dessen Dosierung einer Osteoporosedosis entspricht, über einen Zeitraum von 21 Tagen.

Die 21 Tiere der 4. experimentellen Gruppe erhielten täglich eine subcutane Applikation von Ibandronat (Stammlösung III), dessen Dosierung einer Tumordosis entspricht, über einen Zeitraum von 21 Tagen (Abb. 3).

Exp. Gruppe	Operation	Tieranzahl	Dosis ml/Kg KGW	Häufigkeit	Substanz	Applikationsart	Tage
1	sham	20	0,66	täglich	0,9% NaCl	s.c.	21
2	ovx	24	0,66	täglich	0,9% NaCl = Placebo	s.c.	21
3	ovx	20	0,66	täglich	1µg FAE = Osteoporosedosis	s.c.	21
4	ovx	21	0,66	täglich	25µg FAE = Tumordosis	s.c.	21

Abb. 3: Versuchsplan

Die Anzahl der Tiere pro Gruppe wurde aus den Ergebnissen einer Pilotstudie dieser Studienreihe abgeleitet, aus denen ersichtlich war, dass mit dieser statistisch ausreichenden Anzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erzielt wurde ( $p < 0,01$ ).

Auch die Therapiedauer wurde aufgrund dieser zuvor gewonnenen Erkenntnisse gewählt, da nach Ablauf dieses Zeitraumes nicht mehr mit Änderungen im Vorgang der Knochenmineraldichte bzw. Osteointegration zu rechnen ist.

### 3.5.3. Der chirurgische Eingriff

Die Tiere wurden mit Ketamin in einer Dosierung von 75mg/Kg (Ketanest<sup>®</sup>, 100mg/ml; 0,75ml/Kg) und Xylazin in einer Dosierung von 5mg/Kg (Rompun<sup>®</sup>, 2%ige Lösung, 0,25ml/Kg) in einer Mischspritze intraperitoneal anästhesiert. In Ausnahmefällen wurde eine Nachdosierung notwendig, die das gleiche Mischungsverhältnis hatte, jedoch in halber Menge erfolgte. Auf dem Rücken liegend, wurde die linke Hintergliedmaße großzügig um die Patella rasiert und anschließend das Operationsgebiet mit Betaisadonna Lösung<sup>®</sup> desinfiziert.

Nach steriler Abdeckung erfolgte eine medioparapatellare Arthrotomie des Kniegelenks und die Patella wurde nach lateral disloziert. Der medullare Kanal wurde distal in der intercondylaren Notch eröffnet und mit einem 0,8mm starken Kirschnerdraht bis zur proximalen Metaphyse des Femurs aufgebohrt. Anschließend wurde in den linken Femur ein Hydroxylapatit beschichteter Kirschnerdraht bis in die proximale Metaphyse eingebracht. Das Zugangslloch wurde mit Knochenwachs verschlossen, die Patella reponiert, der Extensorapparat der Hintergliedmaße rekonstruiert, das Weichteilgewebe adaptiert und die Haut mit einer intracutanen Naht (Dexon 2,0) verschlossen.

Postoperativ wurden die Hintergliedmaßen auf eine physiologische Bewegung untersucht und die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt, wo sie sich frei bewegen konnten.

Die Therapie für alle experimentellen Gruppen begann 2 Tage nachdem die letzten Implantate eingebracht waren. Dabei richtete sich die Dosierung nach dem letzten ermittelten Gewicht des jeweiligen Tieres.

### 3.5.4. Euthanasie

Nach Ablauf der Therapiezeit von 21 Tagen wurden die Ratten mit einer Mischspritze aus 0,4ml Ketamin und 0,2ml Rompun<sup>®</sup> intramusculär narkotisiert. Nachdem die Wirkung sichtbar war, wurden sie mit Pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>) in Höhe von 0,5ml intracardial euthanasiert und abschließend gewogen.

3.6. Untersuchungsmethoden

3.6.1. DXA-Analyse

Sowohl die Messung der Knochenmineraldichte vor Therapiebeginn, als auch die Messung der Knochenmineraldichte der frisch toten Tiere wurde mit dem DXA-Gerät Hologic QDR 4500 A im High Resolution Modus durchgeführt (Abb. 4).

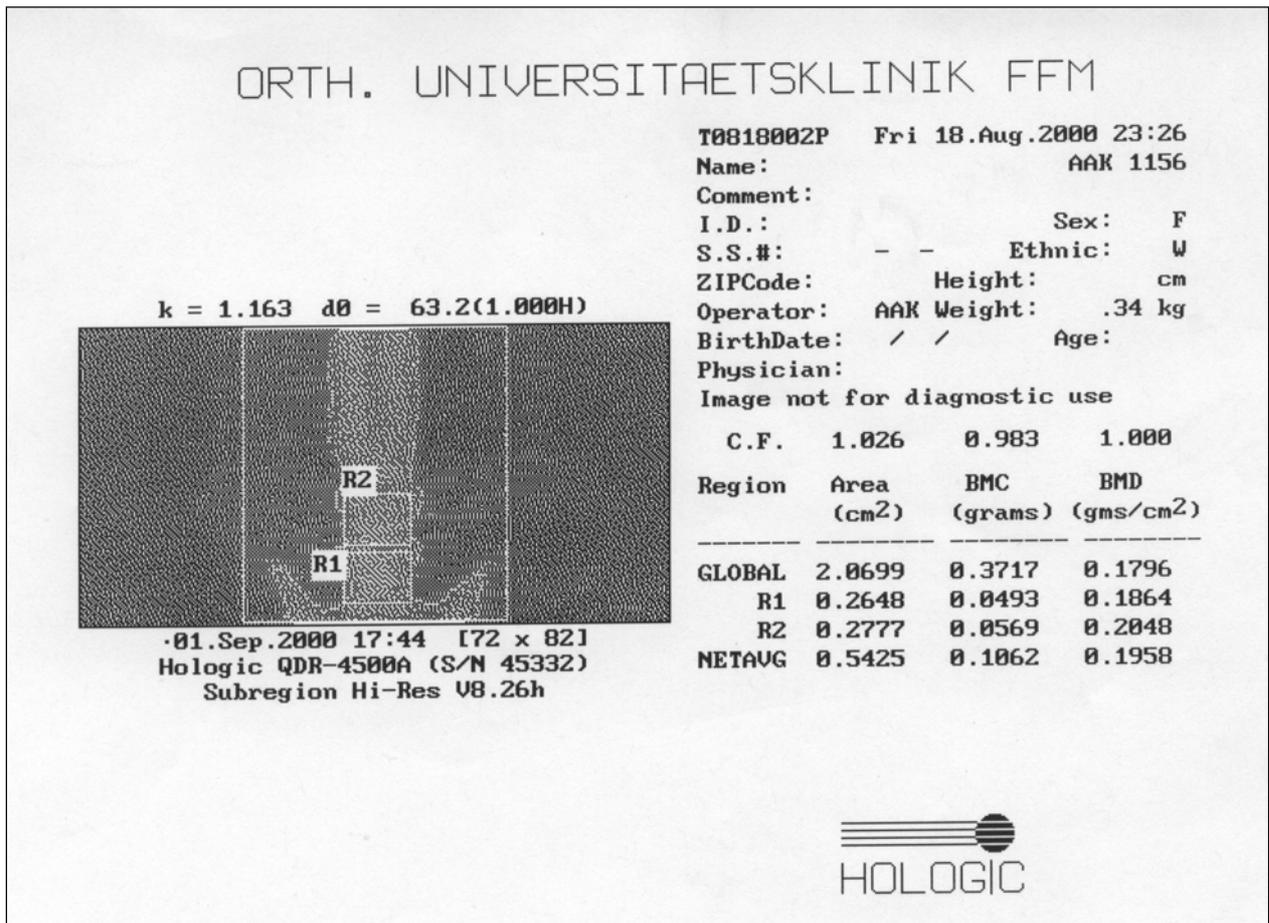


Abb. 4: Beispiel eines DXA-Ausdrucks mit dem verwendeten DXA-Gerät Hologic QDR 4500 A

Dazu wurden die Tiere in einer Haltung gemäß der Längsachse der Wirbelsäule gestreckt und in Brustlage auf ein Plexiglasbrett gelegt. Zur Fixation dienten ein an dem Brett befestigter Seidenfaden, in den die Schneidezähne der Tiere eingehängt wurden und eine Curry-Klemme, in die der Schwanz eingelegt wurde (Abb. 5). Durch die Extension am Schwanz wurde die Lendenwirbelsäule in eine strenge, gerade Position gebracht, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen erreicht wurde.

## Material und Methoden

Der erste Scan begann direkt caudal von L6 und verlief etwa 2,5cm nach cranial.

Somit wurden zwei Unterregionen bezüglich ihrer Knochenmineraldichte ausgewertet:

R1 = L6

R2 = L5

Sowohl das Scanning als auch die Analyse wurden gemäß den Angaben des Handbuchs für das DXA-Gerät über die „small animal software“ vorgenommen.

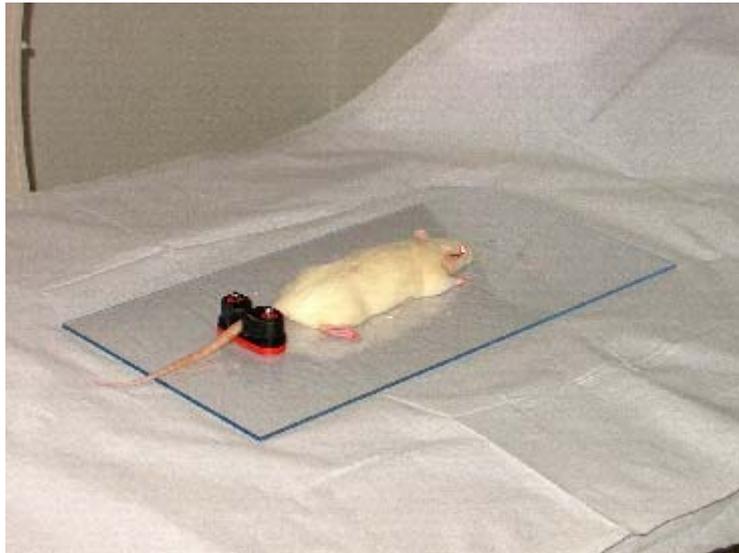


Abb. 5: Typische Lagerung während der DXA-Analyse

### 3.6.2. Sektion

Nach Abschluss der DXA-Messung wurden die Kadaver im Kühlraum der ZFE bis zur Entnahme der Femura bei  $-16^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei der Sektion wurde der linke Femur entnommen und vollständig vom Weichteilgewebe befreit. Anschließend wurde eine Ovarkontrolle durchgeführt, um die Angaben des Lieferanten mit der Zuordnung der Tiere in die jeweiligen experimentellen Gruppen zu überprüfen.

Die freipräparierten Femura wurden für die weitere histologische Bearbeitung in Alkohol fixiert. Hierfür wurde eine aufsteigende Alkoholreihe hergestellt, in welcher die Knochen zur Entwässerung eine bestimmte Zeit verblieben:

## Material und Methoden

40%ige	Ethanollösung	4 Tage
60%ige	Ethanollösung	4 Tage
80%ige	Ethanollösung	4 Tage
90%ige	Ethanollösung	4 Tage
96%ige	Ethanollösung	4 Tage
100%ige	Ethanollösung	3 Tage

### 3.6.3. Röntgen

Vor der letzten Umbettung in die 100%ige Ethanollösung erfolgte die röntgenologische Darstellung der kompletten Rattenfemura. Sie wurden in a.-p. Richtung mit einem Kodak-Film und auf dem Tisch-Technik geröntgt. Das Röntgengerät Nr. 1 der Orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim, Phillips Super 80 CP, hatte die Einstellungen: 100cm Film-Röhren-Abstand, 46KV, 8mAs, 32ms. Zur Beurteilung der groben Morphologie und zur Dokumentation wurde im Seitenvergleich geröntgt, wobei die Knochenareale, in denen es zu einer Veränderung des Knochens, wie z.B. Zu- bzw. Abnahme von trabekulärem Knochen, Veränderungen der Knochendichte, Lockerungssäumen am Implantat, periostale oder endostale Veränderungen gekommen war, besondere Berücksichtigung erfuhren.

### 3.6.4. Präparation

Die in 100%iger Ethanollösung fixierten Femura wurden im Folgenden im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie in der Orthopädischen Universitätsklinik Mannheim in Xylol umgebettet. Nach einer Woche wurden die Knochen in MMA I umgebettet und dort eine Woche belassen, bevor sie in MMA II umgebettet wurden. Schließlich erfolgte eine weitere Woche später die Umbettung in MMA III, wobei die Proben im Wasserbad bei 26°C fest geworden sind.

Die in MMA III (=Plexiglas) ausgehärteten Femura wurden mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Schnitte von konventionell nicht schneidbaren Geweben nach Prof. Donath (104) zersägt. Das hierfür genutzte Gerät war das EXAKT-Trennschleifsystem Makro, Typ Nr. 36/94 3031 CP, Serien Nr. 0033, welches mit 230V, 0,22KW,

## Material und Methoden

50Hz und 1,3A arbeitete. Die Trennbänder wechselten aufgrund von Verschleiß zwischen 0,1mm D64 makro, 0,2mm D64 makro und 0,2mm D91 makro. Die Trenn-Dünnschliff-Technik ist eine bewährte Methode zur Erstellung dünner Schliffe unter 10µm von Implantat tragenden Röhrenknochen zur histologischen Diagnostik.

Von jedem Femur wurden 10 Querschnitte gefertigt. Dabei erfolgte die Schnittfolge grundsätzlich von distal nach proximal. Die Schnittdicke eines jeden Schnittes wurde direkt im Anschluss an den Schnitt in der Mikrometerschraube Mitutoyo Code Nr. 156-101 gemessen. Sie lag im Durchschnitt bei 0,555mm.

Im nächsten Schritt wurden die 10 Schnitte eines jeden Femur geröntgt. Dazu wurden sie auf die Röntgenplatte Kodak Min-R-Casette mit Kodak Min-R screen der Größe 18x24cm gelegt, in die ein Kodak Mammography Film Min-R 2000 eingelegt war. Bei dem Röntgengerät handelte es sich um ein faxitron X-ray corporation, cabinet x-ray system, Model 43855A, S/N 2317 A 01079. Geröntgt wurde bei 20KV, 4sec, ohne Filter und auf der unteren Stufe. Der belichtete Röntgenfilm wurde in der Entwicklermaschine CURIX 160, AGFA, Typ 5200/100, F-Nr. 3559 entwickelt.

Anhand des Röntgenbildes wurde der zu färbende Schnitt ermittelt. Dabei handelte es sich immer um den ersten Schnitt nach der Epiphysenfuge, wodurch die Einheitlichkeit bei der abschließenden histologischen Auswertung und eine sichere Lage des Implantats in der distalen Metaphyse des Femurs gewährleistet wurden.

Die so ermittelten Schnitte wurden nun luftblasenfrei auf Plexiglas-Objektträger der Firma EXAKT aufgeklebt, die zuvor mit Benzin gereinigt wurden. Bei dem Kleber handelte es sich um Technovit 7210 VLC von der Firma Kulzer, der speziell für die Klebepresse der Firma EXAKT Typ/No. 42/230 geeignet ist. Er enthält Methylmethacrylat und härtet unter Blaulicht binnen 15 Minuten aus.

Die aufgeklebten Schnitte wurden nun mit dem Microschleifsystem von EXAKT, Geräte Nr. AW 110/0018 so lange abgeschliffen und geglättet, bis eine Schnitt- und Kleberdicke von durchschnittlich 0,35mm erreicht war.

Schließlich wurden die so vorbereiteten Objektträger für 3 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin SONOREX Super RK 514 BH) gegeben, wodurch die Schnitte von den Schleifpapierkörnchen, die sich in den Ritzen festgesetzt haben, gereinigt wurden.

Im letzten Arbeitsgang wurden die Schnitte für die histologische Auswertung mit der Masson Goldner Färbung (104) angefärbt. Die Trichromfärbung nach Goldner gilt als Standardfärbung für die Knochenmorphometrie, da neben guter Zellfärbung mineralisierte und nicht

## Material und Methoden

mineralisierte Knochenmatrix farblich klar unterschieden werden können. Im Resultat stellt sich das Gewebe unter dem Mikroskop wie folgt dar:

Leuchtend grün	-	Mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen
Hellgrün	-	Verkalkte Knorpelmatrix
Rot	-	Osteoid
Blauschwarz	-	Zellkerne
Rötlich braun	-	Zytoplasma
Orange	-	Erythrozyten

### 3.6.5. Histologie

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte im Knochenforschungslabor der Roche Diagnostics GmbH in Mannheim. Hierzu wurde eine spezielle Software eingesetzt: Das Leica DM RXA – Mikroskop, Typ 020-516.014 I / 97. Das Mikroskop arbeitete mit Durchlicht, Daylightfilter, Step 2, einer Lampeneinstellung von 10,5V und einer zu 2/3 geöffneten Aperturblende.

Um einen Gesamteindruck über das zu beurteilende Präparat zu bekommen, wurde es zunächst in 50-facher Vergrößerung (Objektiv: PL FLUORAR, Okular 5x) begutachtet. Anschließend wurde das gleiche Präparat in 200-facher Vergrößerung betrachtet, wobei sich die Aufmerksamkeit vor allem auf das Anwachsverhalten des Knochens an das Implantat richtete. Diese Anwachszone wurden dokumentiert, da das Bildauswertungsprogramm lediglich mit 50-facher Vergrößerung arbeitete und in dieser die exakten Anwachszone nicht mehr sichtbar abgrenzbar waren. Daraufhin wurde in 16-facher Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme eines jeden Präparats angefertigt und in 100-facher Vergrößerung die einzelnen Quadranten, sofern Knochen an dem jeweiligen Implantatviertel angewachsen war, fotografiert.

Diese Bilder zu schießen, wurde durch die Leica DC 200 Kamera, S/N 050399065, die mit 12V und 300mA arbeitete, ermöglicht, da sie mit dem Mikroskop verbunden war. Des Weiteren war diese Kamera auch mit einem Bildschirm (Sony Triniton Multiscan 20sf II) und dieser wiederum mit einem Computer (Hewlett Packard, S/N NL 94725074, Model VL I Serie 8) verbunden, der mit einer Software ausgestattet war, die das im Mikroskop sichtbare Bild auf den Bildschirm übertrug und eine Auswertung der histologischen Schnitte ermöglichte. Bei dieser Software handelte es sich um Leica Q Win Pro Version 2.3 und das daraus folgende

Programm Quips. Die Leica Q Win Anwendung lief über das Betriebssystem Windows NT und die Bilder wurden in digitalisierter Form über eine Twainschnittstelle in das Programm eingelesen.

Das auf dem Bildschirm sichtbare Messfenster hatte eine Größe von  $1633\mu\text{m}$  (Länge) x  $1198\mu\text{m}$  (Breite), woraus sich eine Messfläche von  $1,96\text{mm}^2$  ergab. Innerhalb dieser Fläche entsprach bei 50-facher Vergrößerung 1 pixel  $1,35\mu\text{m}$ .

Zu Beginn jeder Auswertung wurde der software gesteuerte Scanningtisch des Mikroskops initialisiert und anschließend das Bildauswertungsprogramm gestartet. Das Implantat wurde im Fadenkreuz des Bildschirms zentriert und die Helligkeit und Schärfe angepasst. Ohne jede weitere äußere Manipulation am Mikroskop, lief das Programm von nun an eigenständig. Das Programm unterteilte sich in zwei Teile, wobei sich der erste Teil ausschließlich mit dem Anwachsverhalten des Knochens an das Implantat befasste und der zweite mit der Knochenmenge in der Peripherie. Im ersten Teil wurden somit Schwellenwerte für das Implantat eingegeben, anschließend Schwellenwerte für den Knochen und schließlich konnten die Konturen des Implantats noch bereinigt werden. Aus diesen Eingaben entwickelte das Programm ein Binärbild, das, je nachdem was in der zu Anfang bei 200-facher Vergrößerung dokumentiert wurde, noch bearbeitet werden konnte. Im zweiten Teil wurde der Motortisch des Mikroskops derart von der Software bewegt, dass das gesamte Präparat in vier gleiche Quadranten, die nacheinander denselben Bearbeitungsablauf hatten, unterteilt wurde. Hierbei galt es zunächst, die Schwellenwerte für die Trabekel und dann die Schwellenwerte für das Gewebe einzugeben, und daraufhin das jeweilige Binärbild zu bearbeiten. Im ersten Binärbild war dementsprechend das Ergebnis des Knochens und im zweiten das Ergebnis des Gewebes zu korrigieren. Fazit des zweiten Teils war somit das Verhältnis BV/TV.

Um Veränderungen überhaupt vornehmen zu können, wurde im Vorfeld der Auswertung ein Kriterienkatalog (=Score) erstellt. Er sollte gewährleisten, dass alle Präparate gleichermaßen beurteilt werden. Eine 3-dimensionale Betrachtungsweise vorausgesetzt (100), wurde unterschieden zwischen angewachsen am Implantat und nicht angewachsen.

## Material und Methoden

Als angewachsen galten:

- a) Eine mineralisierte Randzone mit direktem Kontakt zum Implantat
- b) Der an das Implantat grenzende Knochensaum darf nicht unterbrochen sein, um als vollständig angewachsen zu gelten
- c) Schrumpfarfakte

Als nicht angewachsen galten:

- a) Nicht-mineralisiertes Osteoid
- b) Ein Randsaum bzw. Spaltbildung, der kein Artefakt ist

Fehler, die offensichtlich aufgrund mangelhafter Präparation entstanden sind, wobei es sich immer um Luftblasen oder Schleifstaub handelte, wurden als Gewebe bzw. Knochen mit dem Bildauswertungsprogramm der Software übermalt und somit bereinigt.

Als Restgewebe galt alles, was kein Knochen oder Gewebe war. Dabei handelte es sich um das Implantat oder Osteoid.

### 3.7. Statistik

Wenn nicht zusätzlich besonders vermerkt, werden alle Untersuchungsergebnisse einer Gruppe zusammengefasst, und als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes (MW±SD) angegeben.

Ein Wilk-Shapiro-Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten durchgeführt. Ein One-Way-ANOVA-Test und eine Student-Neuman-Keuls (SNK) Post hoc Analyse wurden für alle erhobenen Daten der Gruppen durchgeführt, um Gruppenunterschiede zu beschreiben.

Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ . Zur Analyse wurde eine Sigmastat-Statistik-Software (SPSS, Kalifornien, USA) eingesetzt.

### 4 Ergebnisse

#### 4.1. Tiere

Bereits vor der ersten DXA-Analyse wurde eine Ratte aus der 1. experimentellen Gruppe wegen innerer Blutungen und Blutausfluss aus der Vulva euthanasiert. Während des Anästhesierens zur Operationsvorbereitung verstarb ein weiteres Tier aus der 1. experimentellen Gruppe.

Die Tiere wurden postoperativ täglich auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Alle Ratten waren schon am ersten Tag nach der Operation wach und lebhaft. Sowohl die Bewegung als auch die Belastung der operierten Gliedmaße waren ohne besonderen Befund und die Wundnarben waren trocken und geschlossen. Lediglich bei einem Tier war die Hautnaht gerissen, sodass dieses Tier bis zur Spontanheilung das linke Bein nicht belastete.

Am 13. Tag der Therapie fiel eine Ratte aus der 3. experimentellen Gruppe während des Spritzens in einen Krampfzustand, der sich nicht mehr löste, sodass sie schließlich euthanasiert werden musste.

Bei der histologischen Auswertung wurden bei 2 Tieren aus der 1. experimentellen Gruppe, bei 3 Tieren aus der 2. experimentellen Gruppe, bei 4 Tieren aus der 3. experimentellen Gruppe und bei 3 Tieren aus der 4. experimentellen Gruppe periprothetische Infektionen gefunden, die eine Osteointegration verhindert haben.

Aufgrund der Tierverluste bzw. Infektionen konnten zur Auswertung letztendlich in der 1. experimentellen Gruppe 15 Tiere, in der 2. experimentellen Gruppe 21 Tiere, in der 3. experimentellen Gruppe 15 und in der 4. experimentellen Gruppe 18 Tiere herangezogen werden.

Nebenwirkungen der Testsubstanz Ibandronat konnten während der 21-tägigen Therapiezeit nicht beobachtet werden. Ob der Krampfzustand während der Injektion auf die Substanz zurückzuführen ist, war nicht zu klären.

## Ergebnisse

### 4.2. Gewichtsveränderung

Sowohl bei den Tieren der 1. experimentellen Gruppe, als auch bei den Tieren der 2. experimentellen Gruppe kam es über den Therapiezeitraum zu einer Gewichtsreduktion. Die Tiere der 3. und 4. experimentellen Gruppe hingegen zeigten eine Gewichtszunahme (Abb. 6). Dabei war das Körpergewicht aller ovariectomierter Tiere zu jeder Zeit höher als das der sham-operierten Tiere. Sowohl vor Beginn der Therapie als auch danach wies die 2. experimentelle Gruppe das größte Körpergewicht aller Gruppen auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren zu keiner Zeit signifikant.

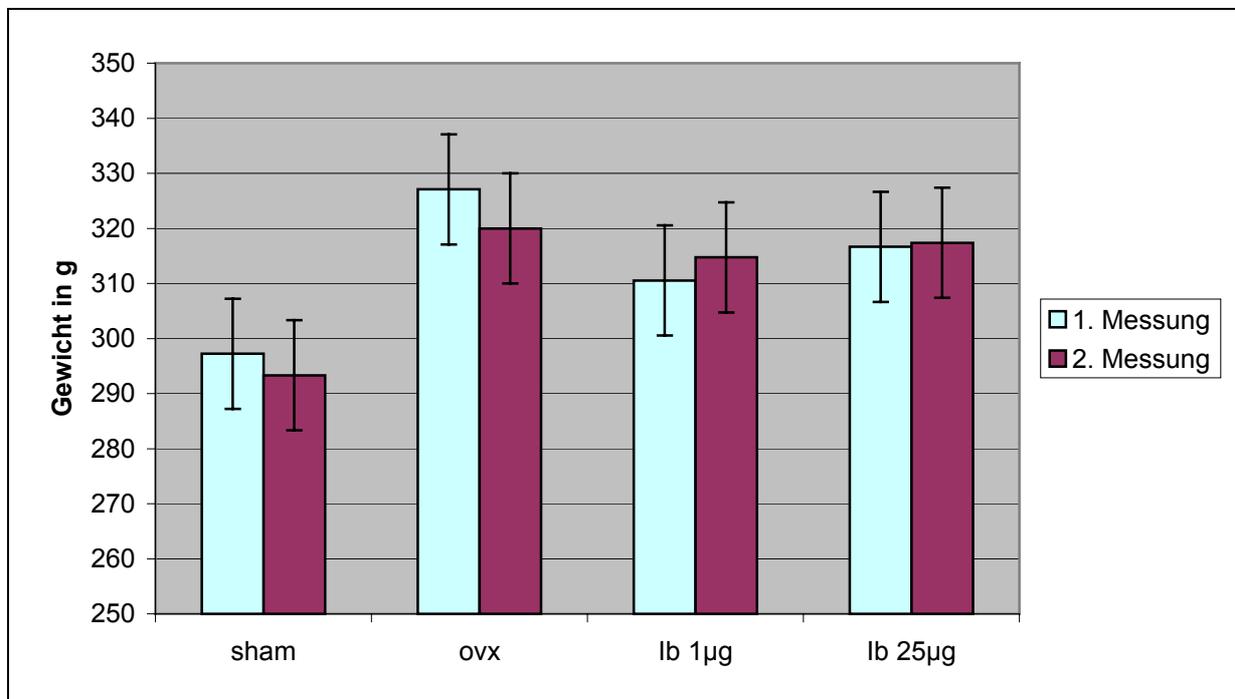


Abb. 6: Gewichtsveränderungen bei den experimentellen Gruppen

### 4.3. DXA-Analyse

Bei allen Tieren der 4 experimentellen Gruppen wurde die Knochenmineraldichte (BMD) der Lendenwirbelkörper 5 und 6 vor Therapiebeginn und nach Therapieende ermittelt.

13 Wochen nach der Ovariectomie und vor Beginn der Therapie, war die BMD von allen ovariectomierten Tieren im Vergleich zu den sham-operierten Tieren signifikant ( $p < 0,05$ ) um 7,8-14,7% zurückgegangen (Abb. 9). Zwischen den drei ovariectomierten Gruppen gab es vor Therapiebeginn keinen signifikanten Unterschied bezüglich der BMD (Abb. 9).

## Ergebnisse

Die Werte der BMD nahmen in allen Gruppen an beiden Messstellen über den Therapiezeitraum signifikant zu (Abb. 8). Dabei wiesen die Tiere, die mit Ibandronat behandelt worden waren, eine signifikant höhere BMD beider Lendenwirbelkörper (um 10,6-15,0%) auf, als die Tiere der ovariectomierten Kontrollgruppe (Abb. 9). Die Tiere, die mit 25µg/kg Ibandronat behandelt worden waren, zeigten an beiden Messstellen die höchste BMD. Geringfügig niedriger war die BMD der Tiere, die mit 1µg/kg Ibandronat therapiert worden waren. Die Werte der sham-operierten Tiere lagen zwar unter den Werten der beiden Ibandronat Gruppen, aber dennoch über den Werten der ovariectomierten Kontrollgruppe (Abb. 7).

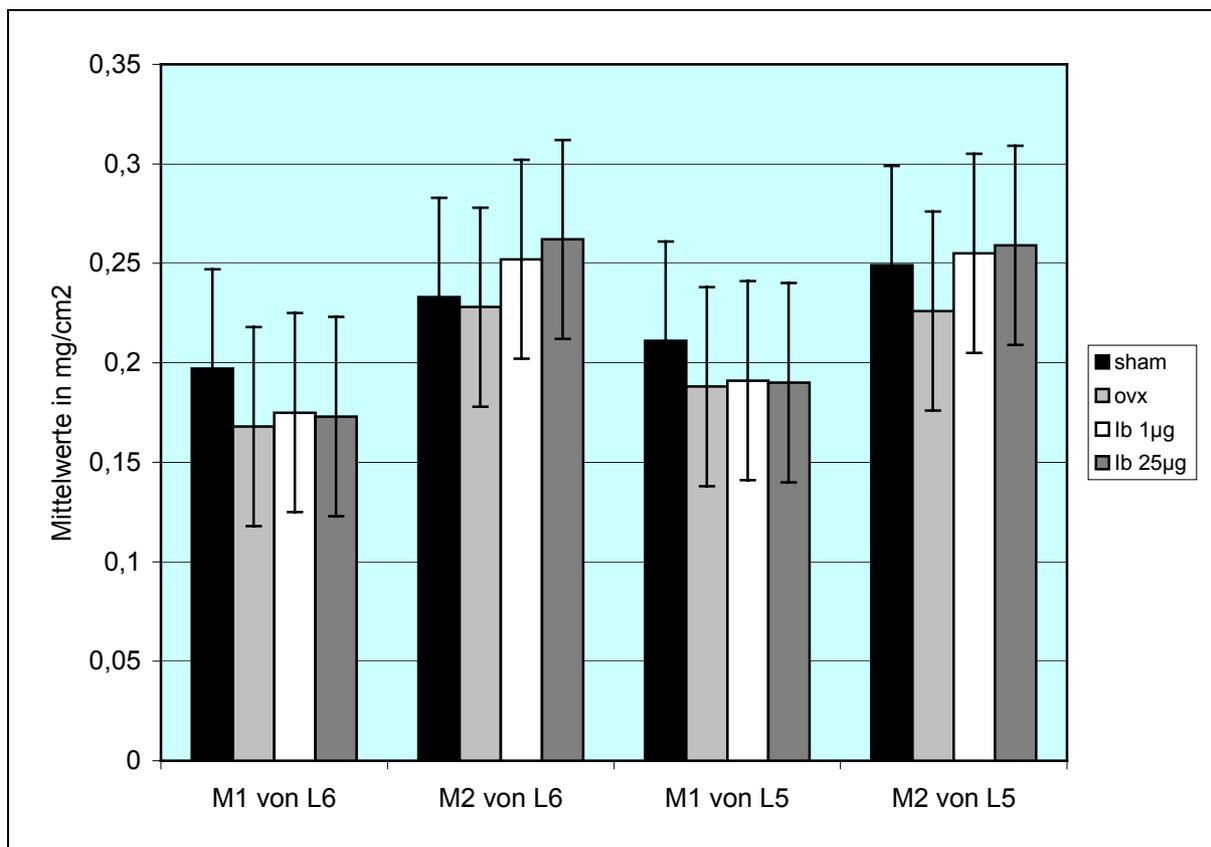


Abb. 7: Mittelwerte der Knochenmineraldichte von L6 und L5 vor und nach der Therapie

	M1 von L6	M2 von L6	M1 von L5	M2 von L5
Exp. Gruppe	MW und (SD) in mg/cm <sup>2</sup>			
sham	0,197 (0,027)	0,233 (0,037)	0,211 (0,022)	0,249 (0,033)
ovx	0,168 (0,039)	0,228 (0,018)	0,188 (0,033)	0,226 (0,027)
lb 1µg	0,175 (0,010)	0,252 (0,019)	0,191 (0,013)	0,255 (0,022)
lb 25µg	0,173 (0,001)	0,262 (0,022)	0,190 (0,016)	0,259 (0,017)

Abb. 8: Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Knochenmineraldichte der Lendenwirbelkörper (L) 5 und 6 bei den Messungen (M) vor Therapiebeginn (1) und nach Therapieende (2).

## Ergebnisse

Die ovariectomierten Tiere, die mit 25µg/kg Ibandronat behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu den sham-operierten Tieren eine signifikante Zunahme der BMD an Lendenwirbelkörper 6, jedoch nicht an Lendenwirbelkörper 5. Die Therapie mit 1µg/kg Ibandronat bewirkte eine Erhöhung der BMD auf das Niveau der sham-operierten Gruppe (Abb. 9). Die Unterschiede zwischen den beiden Ibandronat Gruppen, im Hinblick auf die Veränderungen der BMD, waren hingegen nicht signifikant.

	M1 von L6	M1 von L5	M2 von L6	M2 von L5
Vergleich	Signifikante Differenz in %			
sham vs. ovx	-14,7	-9,1	n.s.	-9,3
sham vs. Ib 1µg	-11,2	-7,8	n.s.	n.s.
sham vs. Ib 25µg	-12,2	-8,4	+12,9	n.s.
Ib 1µg vs. ovx	n.s.	n.s.	+10,6	+12,7
Ib 1µg vs. Ib 25µg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ib 25µg vs. ovx	n.s.	n.s.	+15,0	+14,6

Abb. 9: Signifikante Unterschiede der BMD an den unterschiedlichen Messstellen im Vergleich der experimentellen Gruppen miteinander; angegeben in Prozent ( $p < 0,05$ )

### 4.4. Röntgenbildanalyse

Die Auswertung der Röntgenübersichtsaufnahmen lieferte einen groben Überblick über die Positionierung der Implantate.

Alle Implantate waren ordnungsgemäß in der Femurmarkhöhle lokalisiert und von trabekulärem Knochen umgeben.

Lockerungssäume am Implantat waren radiologisch nicht erkennbar (Abb. 10).

## Ergebnisse

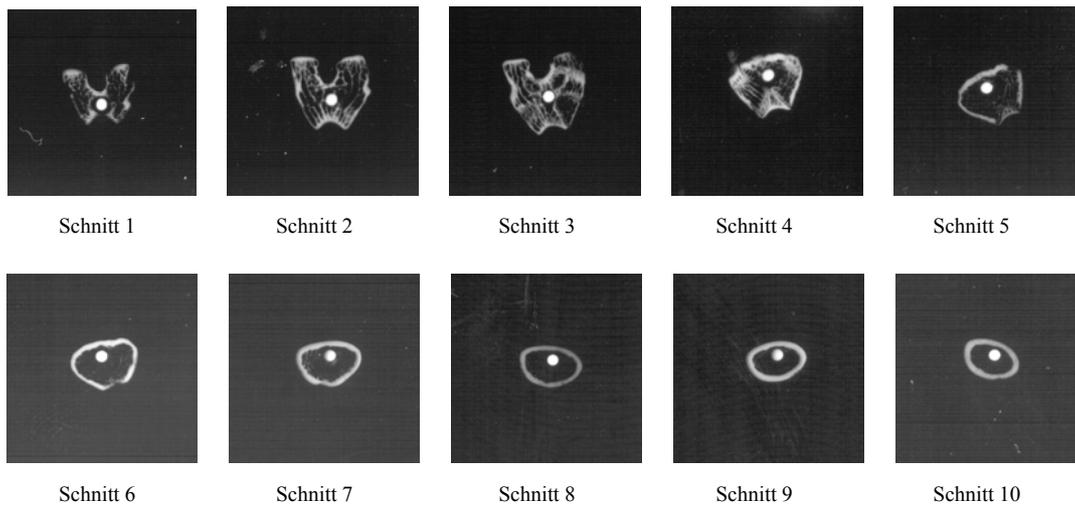


Abb. 10: Röntgenologische Darstellung eines Femur, zum Nachweis der korrekten Positionierung des Implantats und zur Ermittlung des zu färbenden Schnittes (Schnittfolge von distal nach proximal)

### 4.5. Histologie

Die Betrachtung der histologischen Schnitte bei 16-facher Vergrößerung ließ zwischen den experimentellen Gruppen deutliche Unterschiede bezüglich der Knochenmenge in der Peripherie erkennen. Tiere, die 25 $\mu$ g/kg Ibandronat erhielten, zeigten die größte Dichte trabekulären Knochens, dicht gefolgt von den Tieren, die mit 1 $\mu$ g/kg Ibandronat therapiert wurden. Etwas geringer stellte sich die Knochenmenge bei den sham-operierten Tieren dar und bei den Tieren der ovariectomierten Kontrollgruppe fanden sich kaum trabekuläre Knochenstrukturen (Abb. 11-14).

## Ergebnisse

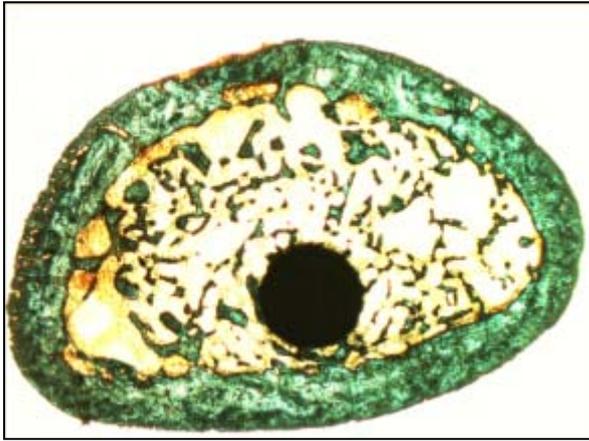


Abb. 11: Histologische Darstellung des ersten Schnittes nach der Epiphysenfuge mit der für ein Tier aus der sham-Gruppe typischen Menge trabekulären Knochens (Färbung Goldner; Vergrößerung 16fach)

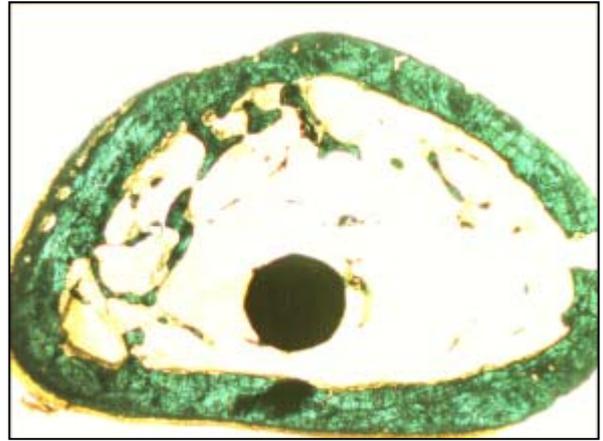


Abb. 12: Histologische Darstellung des ersten Schnittes nach der Epiphysenfuge mit der für ein Tier aus der ovx-Gruppe typischen Menge trabekulären Knochens (Färbung Goldner; Vergrößerung 16fach)

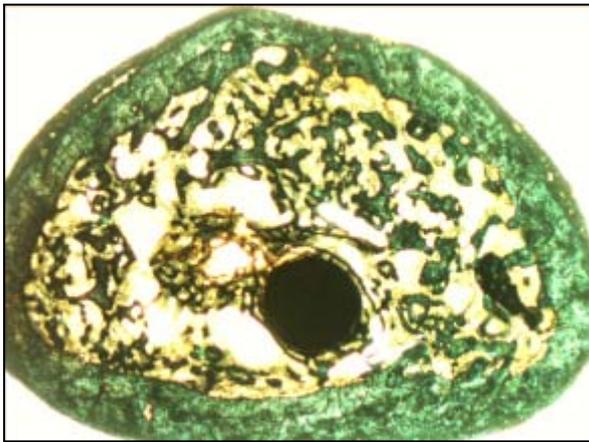


Abb. 13: Histologische Darstellung des ersten Schnittes nach der Epiphysenfuge mit der für ein Tier aus der 1µg/kg Ibandronat-Gruppe typischen Menge trabekulären Knochens (Färbung Goldner; Vergrößerung 16fach)

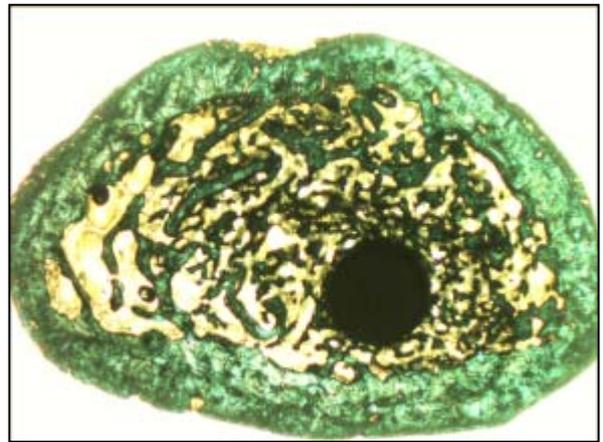


Abb. 14: Histologische Darstellung des ersten Schnittes nach der Epiphysenfuge mit der für ein Tier aus der 25µg/kg Ibandronat-Gruppe typischen Menge trabekulären Knochens (Färbung Goldner; Vergrößerung 16fach)

Die Osteointegration war durch den Einfluss von 25µg/kg Ibandronat bei den Tieren der 4. experimentellen Gruppe am ausgeprägtesten. Die sham-operierte Gruppe und die Tiere der 3. experimentellen Gruppe wiesen eine ähnlich gute Osteointegration auf, die im Vergleich zur 4. experimentellen Gruppe jedoch geringer ausfiel. Die osteointegrierte Oberfläche der Tiere aus der 2. experimentellen Gruppe war mit Abstand am geringsten (Abb. 15, 16).

## Ergebnisse

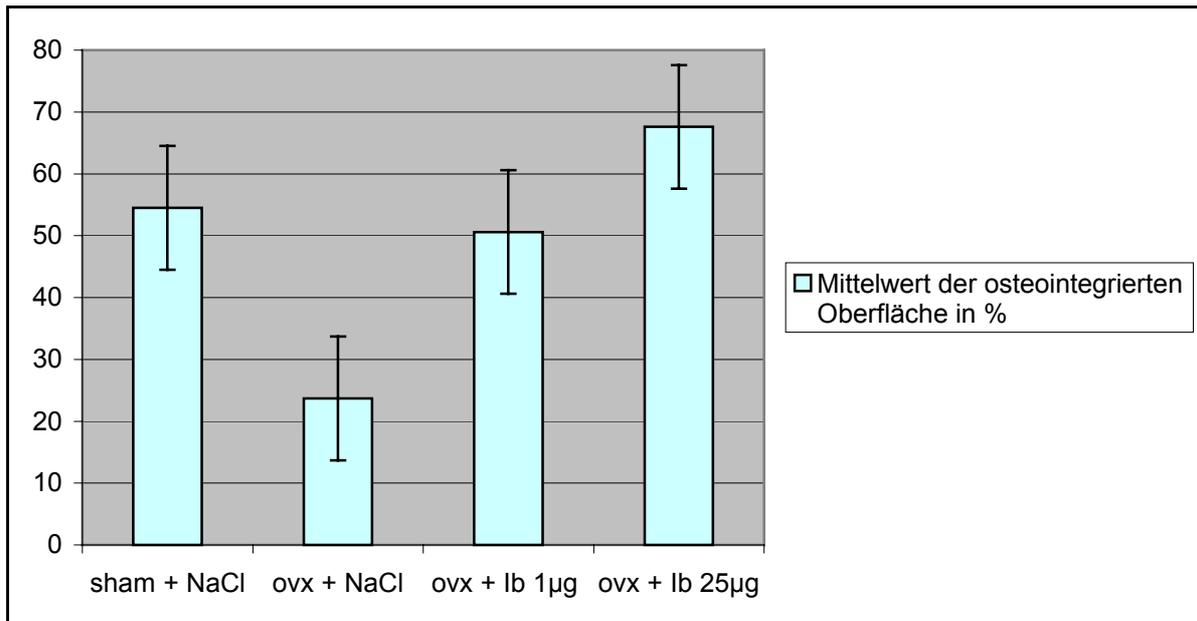


Abb. 15: Mittelwert und Standardabweichung der osteointegrierten Oberflächen aller experimentellen Gruppen

Gruppe	Proben	MW % osteointegr. Oberfläche	SD
sham + NaCl	15	54,5	25,5
ovx + NaCl	21	23,7	18,6
ovx + Ib 1µg	15	50,6	24,4
ovx + Ib 25µg	18	67,6	26,8

Abb. 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der osteointegrierten Oberfläche in Prozent bei den verschiedenen experimentellen Gruppen

Die histomorphometrische Auswertung ergab eine osteointegrierte Oberfläche von  $54,5 \pm 25,5\%$  in der sham-operierten Gruppe, gegenüber  $23,7 \pm 18,6\%$  in der ovariectomierten Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die mit  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat behandelt worden waren, lag die osteointegrierte Oberfläche bei  $50,6 \pm 24,4\%$ . Die Tiere, die mit  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat therapiert worden waren, hatten eine osteointegrierte Oberfläche von  $67,6 \pm 26,8\%$  (Abb. 16).

## Ergebnisse

Im direkten Vergleich der experimentellen Gruppen miteinander, war die osteointegrierte Oberfläche der ovariectomierten Tiere, die 1µg/kg und 25µg/kg Ibandronat erhielten, 113,5% und 185,0% höher als die der ovariectomierten Kontrollgruppe (Abb. 17). Die osteointegrierte Oberfläche der sham-operierten Tiere war um 56,5% größer als die der ovariectomierten Kontrollgruppe. Nicht signifikant waren die Unterschiede im Hinblick auf die osteointegrierte Oberfläche zwischen den beiden, mit Ibandronat behandelten Gruppen, und diesen im Vergleich zu der sham-operierten Gruppe (Abb. 17).

Vergleich	Differenz der MW osteointegr. Oberfl. in %	Signifikante Differenz in %
sham + NaCl vs. ovx + NaCl	30,8	-56,5
ovx + Ib 1µg vs. ovx + NaCl	26,9	+113,5
ovx + Ib 25µg vs. ovx + NaCl	43,9	+185,0
ovx + Ib 25µg vs. ovx + Ib 1µg	17,0	n.s.
ovx + Ib 25µg vs. sham + NaCl	13,1	n.s.
ovx + Ib 1µg vs. sham + NaCl	3,9	n.s.

Abb. 17: Gruppenvergleich der osteointegrierten Oberfläche in Prozent ( $p < 0,05$ )

Die Betrachtung der histologischen Schnitte in 100-facher Vergrößerung erlaubte eine sichere Dokumentation der Anwachszonen auf Bildern (Abb. 18 und 19). Das Implantat integrierende Trabekel und Schrumpfarfakte, sowie nicht-mineralisiertes Osteoid und Spaltbildungen konnten unter dem Mikroskop klar voneinander unterschieden werden.

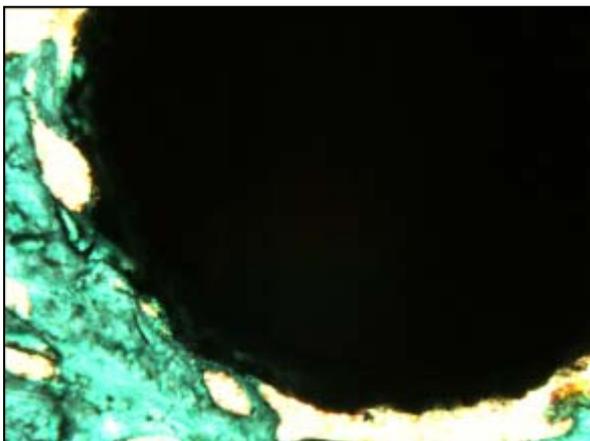


Abb. 18: Histologische Darstellung eines leuchtend grünen, teilweise angewachsenen Trabekels an das Implantat (Färbung Goldner; Vergrößerung 100fach)



Abb. 19: Histologische Darstellung eines leuchtend roten Osteoid-Ringes parallel zum Implantat (Färbung Goldner; Vergrößerung 100fach)

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

- a) Verschlechtert eine simulierte Osteoporose durch Ovariectomie bei Ratten die Osteointegration von HA beschichteten Implantaten?
- b) Kann die Gabe von 1µg/kg Ibandronat die Osteointegration von HA Implantaten in Ratten mit einer simulierten Osteoporose verbessern?
- c) Welchen Einfluss hat die Gabe von 1µg/kg Ibandronat auf die Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule in Ratten mit einer simulierten Osteoporose?
- d) Kann die Gabe von 25µg/kg Ibandronat die Osteointegration von HA Implantaten in Ratten mit einer simulierten Osteoporose gegenüber der Kontrollgruppe und der mit 1µg/kg Ibandronat behandelten Gruppe verbessern?
- e) Welchen Einfluss hat die Gabe von 25µg/kg Ibandronat auf die Knochenmineraldichte der Lendenwirbelsäule in Ratten mit einer simulierten Osteoporose?

Diese Studie an einem Rattenmodell zeigt eindeutig, dass eine tägliche subcutane Therapie mit Ibandronat eine Zunahme der Knochenmineraldichte und eine Verbesserung der Osteointegration bei osteoporoseinduziertem Knochenverlust bewirkt.

Voraussetzung für die Brauchbarkeit gewonnener experimenteller Untersuchungsergebnisse als Grundlage für den Vergleich mit den beim Mensch zu erwartenden Verhältnissen, ist die Wahl eines geeigneten Tiermodells. Die Wahl fiel auf ein Rattenmodell, da es sich hierbei um das am besten untersuchte Tiermodell in der Osteoporoseforschung handelt (37, 56, 132). Die Veränderungen im Knochenstoffwechsel bei ovariectomierten Ratten gleichen weitestgehend den Folgen des Knochenverlustes im menschlichen Klimakterium. So belegen die Ergebnisse der 1. DXA-Messung eindeutig, dass es an beiden Messstellen aufgrund des Östrogenmangels bei den ovx-Gruppen zu einem Anstieg des Knochenstoffwechsels mit verstärkter Resorptionsleistung und fortschreitendem Knochenverlust kam. Im Vergleich der einzelnen Gruppen zu der sham-operierten Gruppe waren diese Veränderungen signifikant. Hingegen gab es keine signifikante Differenz der Knochenmineraldichte zwischen den verschiedenen ovariectomierten Gruppen.

## Diskussion

Die Ergebnisse der 2. DXA-Messung ließen in allen experimentellen Gruppen an beiden Messstellen eine Zunahme der Knochenmineraldichte erkennen. Im Vergleich mit der 1. Messung zeigte sich durch die Therapie mit 1µg/kg Ibandronat eine Zunahme der Knochenmineraldichte an L6 von 44% und an L5 von 34%. Die 25µg/kg Dosis Ibandronat bewirkte an L6 sogar eine Zunahme von 51% und an L5 eine Zunahme von 36%. Die Unterschiede zwischen den beiden Dosierungsgruppen bei den Änderungen der Knochenmineraldichte sind statistisch nicht signifikant. Im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander hatten alle Ratten, die mit Ibandronat therapiert wurden, eine um 10,6 bis 15,0% höhere Knochenmineraldichte als die Tiere aus der Placebo-Gruppe. Diese Differenz ist signifikant. Verglichen mit der sham-operierten Gruppe, zeigten die Tiere, die mit 25µg/kg Ibandronat therapiert worden waren, eine signifikante Zunahme der Knochenmineraldichte an L6 aber nicht an L5. Die Tiere der 3. experimentellen Gruppe erlangten aufgrund der Therapie mit 1µg/kg Ibandronat eine Steigerung der Knochenmineraldichte, die dem Niveau der sham-operierten Gruppe entsprach.

Itoh et al. (52) verglichen die Wirkung von Clodronat und Etidronat auf die durch Ovariectomie induzierte Osteopenie bei Ratten. Die Knochenmineraldichte reduzierte sich bei den ovariectomierten Tieren aufgrund des Östrogenmangels bis zum Beginn der Therapie, speziell im trabekulären Knochen, deutlich. Beide Bisphosphonate kehrten diesen Effekt sowohl in den Lendenwirbelkörpern als auch im Femur bis auf sham-operiertes Niveau um. Allerdings erfolgte die Zunahme der Knochenmineraldichte unter dem Einfluss von Clodronat über den gesamten Dosisbereich (4, 10, 25mg/kg, s.c., 2 x wöchentlich), wohingegen Etidronat nur bei der geringsten Dosis seine Wirkung entfaltete. Bauss et al. (10) untersuchten die Auswirkungen einer Behandlung mit Ibandronat auf den Knochenverlust und die Knochenmineraldichte bei ovariectomierten Ratten. 10 Wochen nach der Ovariectomie und vor Therapiebeginn konnten sie bei den ovariectomierten Tieren eine signifikante Reduktion der Knochenmasse ( $p \leq 0,0001$ ) feststellen. Nach Ablauf der 12-monatigen Behandlungsperiode, während der den Ratten tägliche Dosen von 0,2µg/kg bis 25µg/kg Ibandronat subcutan verabreicht worden waren, hatte Ibandronat eine deutliche Zunahme der Knochenmineraldichte bewirkt. Die geringste Dosis, mit der ein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrolltieren erzielt wurde, lag dabei zwischen 0,2µg/kg und 1,0µg/kg Ibandronat. Die Ergebnisse dieser Studien stimmen im wesentlichen mit der eigenen Untersuchung überein.

## Diskussion

Die Ergebnisse beweisen weiterhin, dass Ibandronat die Osteointegration der Hydroxylapatit beschichteten Titanimplantate verbessert, wenngleich der durch die Ovariectomie induzierte Knochenverlust das Einwachsverhalten beeinträchtigt.

So war die osteointegrierte Oberfläche der Placebo-Gruppe deutlich geringer als die der anderen 3 experimentellen Gruppen. Auch Hara et al. (46) untersuchten die Osteointegration von Hydroxylapatit beschichteten Implantaten im Femur von ovariectomierten und sham-operierten Ratten. Zwar waren die Implantate beider Gruppen ringsum mit neuem Knochen bedeckt, aber die Osteointegration bei den ovariectomierten Tieren war deutlich vermindert. Motohashi et al. (82) kamen mit ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass sowohl die Knochenmenge in der Peripherie als auch der Knochen/Implantat Kontakt im trabekulären Knochenbereich bei den ovariectomierten Ratten im Vergleich zu den sham-operierten Tieren signifikant vermindert war. Dies führten sie auf den durch die Ovariectomie induzierten Knochenverlust zurück, womit die Ergebnisse dieser Studie bestätigt werden.

Die osteointegrierte Oberfläche der Tiere aus der 3. experimentellen Gruppe, die mit 1µg/kg Ibandronat therapiert worden waren, war um 113,5% größer als die der Placebo-Gruppe, welche wiederum 56,5% kleiner war als die der sham-operierten Gruppe. Das beste Anwachsverhalten fand sich bei den Tieren aus der 4. experimentellen Gruppe, die mit 25µg/kg Ibandronat therapiert worden waren. Im direkten Vergleich dieser Gruppe mit der Placebo-Gruppe, zeigte sich ein signifikanter Unterschied der osteointegrierten Oberfläche von 185,0% ( $p < 0,05$ ). Nicht signifikant hingegen waren die Unterschiede zwischen den beiden mit Ibandronat behandelten Gruppen und diesen im Vergleich zu der sham-operierten Gruppe. Aufgrund mangelnder Studien auf diesem Gebiet steht leider kaum Literatur zur Verfügung, die einen direkten Vergleich mit den gewonnenen Ergebnissen erlaubt. Frenkel et al. (34) haben die Wirkung von Alendronat auf die Knochenneubildung und die Bindung an die Implantatoberfläche in einem normalen und einem simulierten östrogen-defizienten Hundemodell mit Hilfe von implantierbaren Knochenwachskammern, deren Oberflächen zum Teil mit Hydroxylapatit beschichtet waren, getestet. Alendronat hatte keinen Einfluss auf die Osteointegration, weder bei den normalen noch bei den ovariectomierten Tieren. Tokugawa et al. (124) untersuchten in ihrer Studie die Wirkung von 10µg/kg Incadronat bei ovariectomierten Ratten im Vergleich zu sham-operierten und ovariectomierten Tieren, nachdem allen Tieren ein Titanimplantat in die Tibia eingebracht worden war. Aufgrund des erhöhten Knochenstoffwechsels mit verstärkter Resorptionsleistung waren bei den ovariectomierten Tieren der Knochen/Implantat Kontakt und die Knochenmenge in der Peripherie signifikant reduziert. Bei den ovariectomierten Tieren, die mit Incadronat therapiert

## Diskussion

worden waren, wurden jedoch sowohl bezüglich der Osteointegration als auch der Knochenmenge in der Peripherie nur unbedeutende Unterschiede mit den sham-operierten Tieren festgestellt. Zudem wurde in der Incadronat-Gruppe die gewobene neue Knochenstruktur durch ausgereiften Lamellenknochen ersetzt. Nachdem Narai et al. (84) ihre Ratten ovariectomiert oder sham-operiert hatten, wurden die ovariectomierten Tiere in eine Alendronat-Gruppe und eine Kontroll-Gruppe geteilt. Allen Tieren wurde mit dem Beginn der Therapie ein Titanimplantat in den Femur eingebracht. Nach 1 Monat Behandlungsdauer war der Knochen/Implantat Kontakt in der Alendronat-Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant höher. Keinen signifikanten Unterschied gab es bezüglich der Osteointegration zwischen der Alendronat-Gruppe und den sham-operierten Tieren, jedoch eine leichte Tendenz zugunsten der Alendronat-Gruppe.

Bei der Implantation von zementfreien Prothesen ist das schnelle Erreichen der sekundären Stabilität durch den Prozess der Osteointegration ein entscheidendes Kriterium. Von der Osteointegration hängt sowohl die frühe Rehabilitation als auch das Langzeitüberleben des Gelenkersatzes ab. Die Oberflächenbeschichtung mit Hydroxylapatit trägt nachweislich dazu bei, die stabile Fixation zu erhöhen. Im Vergleich mit derselben Implantatgrundsubstanz ohne Beschichtung kommt es zu einer deutlich gesteigerten Knochenanlagerung. Das gilt sowohl für die Implantation derartig beschichteter Prothesen in gesunden Knochen (25, 46) als auch in osteoporotischen Knochen (46).

Allerdings zeigt die vorliegende Rattenstudie, dass bei bestehender Osteoporose die Osteointegration der Hydroxylapatit beschichteten Titanimplantate im Femur beeinträchtigt wird. Diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen aus anderen Studien überein. So fanden Motohashi et al. (82) anhand ihres Rattenmodells heraus, dass durch eine Ovariectomie die Knochenheilung nach der Implantation von HA beschichteten Implantaten im kortikalen Knochen nicht ernsthaft beeinflusst wird, im trabekulären Knochen jedoch eine signifikante Reduktion der Osteointegration sowie der Knochenmenge in der Peripherie bewirkt wird. Pan et al. (89) implantierten ihren Ratten zuerst HA beschichtete Titanstäbe und ovariectomierten die Hälfte von ihnen erst 168 Tage später. Im Ergebnis stimmte die Studie jedoch vollkommen mit der von Motohashi et al. (82) überein. Auch bei den ovariectomierten, osteoporotischen Kaninchen, die Lugero et al. (70) in ihrer Studie untersuchten, war das Einwachsverhalten an die HA beschichteten Titanimplantate im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verzögert. Hara et al. (46) fanden heraus, dass die HA Beschichtung der Implantate den Knochen/Implantat Kontakt zwar wesentlich verbesserte, dieser aber bei den

ovarektomierten Tieren im Vergleich zu den sham-operierten Tieren um 40,3% geringer war. Es liegt daher nahe, die Ergebnisse dieser Studie mit denen von Patienten zu vergleichen, die an Osteopenie, primärer oder sekundärer Osteoporose erkrankt sind. Auch bei ihnen sollten HA beschichtete Implantate die Fixation einer zementfreien Hüftgelenksprothese verbessern können, die Reichweite dieses Nutzens jedoch durch eine bestehende Osteoporose beeinträchtigt werden.

Obwohl die Beschichtung der Implantatoberfläche mit Hydroxylapatit alleine schon eine Verbesserung der Osteointegration in osteoporotischem Knochen herbeiführt, werden Bemühungen unternommen, die Osteointegration weiter zu verbessern. Durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren wird auch bei zementfrei implantierten Prothesen dieses Ziel erreicht (115, 114, 67, 68). PTH und rhTGF-beta1 beschleunigen die stabile Fixation einer Prothese durch die Erhöhung der Knochendichte des umgebenden Knochens und eine Zunahme des Implantat/Knochen Kontaktes. Um aber auch das Langzeitüberleben eines künstlichen Gelenkersatzes zu sichern, ist der zusätzliche Einsatz von Bisphosphonaten vielversprechend.

Die Substanzgruppe der Bisphosphonate zeichnet sich in ihrer Wirkung durch einen Rückgang des Knochenumbaus aus, wobei der biologische Haupteffekt in der Hemmung der Knochenresorption liegt. Diese Resorptionsabnahme geht nachweislich mit einer Erhöhung des Knochenmineralgehaltes und der Calciumbilanz einher (103). Ibandronat hemmt nachweislich die Knochenresorption sowohl bei gesunden Tieren (33) als auch bei ovarektomierten Ratten (10), Hunden (80, 81) und Affen (116). Studien an gesunden Männern, postmenopausalen Frauen und spätenopausalen Frauen mit manifester Osteoporose bestätigen die Ergebnisse dieser Tiermodelle, indem ebenfalls signifikante Zunahmen der Knochenmineraldichte an Wirbelsäule und Hüfte gefunden wurden (1, 90, 101).

Auch in der vorliegenden Studie bewirkte Ibandronat eine deutliche Zunahme der Knochenmineraldichte, womit sich die Ergebnisse in das internationale Wissen einreihen. Bereits in der geringeren Dosierung von 1µg/kg Ibandronat, die einer klinisch therapeutischen Osteoporosedosis entspricht, erfolgte eine Angleichung der Knochenmineraldichte der ovarektomierten Tiere auf das Niveau der sham-operierten Tiere. Bei der Dosierung von 25µg/kg Ibandronat, die einer Tumordosis gleicht, zeigte sich im Vergleich mit den sham-operierten Tieren eine signifikante Erhöhung der Knochenmineraldichte an L6, jedoch nicht an L5.

## Diskussion

Die quantitative Beurteilung der Knochenmineraldichte erfolgte mittels DXA-Messung. Umfangreiche und vergleichende Studien beweisen, dass die DXA-Messung eine sehr genaue Möglichkeit darstellt, bei Ratten Veränderungen der Knochenmineraldichte selbst über kurze Zeitperioden aufzuzeigen. Dabei liefert speziell die Lendenwirbelsäule aufgrund ihres hohen trabekulären Knochengehaltes präzise Ergebnisse (3, 38). Auch Ammann et al. (2) untersuchten die Wirkung von Tiludronat auf die Knochenmineraldichte von ovariectomierten Ratten, indem sie die Veränderungen durch DXA-Messungen an der Lendenwirbelsäule (L1-L4), am Schwanz (C2-C4) und vier verschiedenen Regionen der Tibia (proximaler, 2x medialer und distaler Teil) dokumentierten. Beide Eingriffe, Ovariectomie und Therapie, führten in Bereichen mit hohem trabekulärem Knochengehalt, wie Lendenwirbelsäule und proximaler Tibia, zu auffälligen Veränderungen der Knochenmineraldichte. Bereiche mit mehrheitlich kortikalem Knochen, wie der mediale Teil der Tibia, waren hingegen nur gering oder gar nicht betroffen. Obwohl auch die Schwanzwirbel vermehrt trabekulären Knochen aufweisen, wirkten sich die Eingriffe in dieser Region wesentlich weniger auf Veränderungen in der Knochenmineraldichte aus. Rosen et al. (105) fanden anhand von DXA-Messungen heraus, dass Änderungen in der Knochenmineraldichte aufgrund einer Behandlung mit Pamidronat in der Region des distalen Femur am stärksten ausgeprägt sind, da diese Region im Vergleich zu dem medialen oder distalen Bereich reicher an trabekulärem Knochen ist. Auch in der vorliegenden Studie konnte die große Dichte von trabekulärem Knochen in den mit Ibandronat behandelten Gruppen neben den DXA-Messungen anhand der histologischen Schnitte und Röntgenbilder nachgewiesen werden.

Bisphosphonate bewirken jedoch nicht nur den Erhalt und eine Steigerung der Knochenmineraldichte, sondern vor allem auch eine signifikante Reduktion des Risikos für osteoporotische Frakturen (20, 47, 128). Frakturen von Wirbelkörpern, Schenkelhals und distalem Radius sind es, die als Endpunkt der Erkrankung letztlich das klinische Bild der Osteoporose prägen und die entsprechenden Folgekosten für die Gesellschaft verursachen. Aufgrund dieses Wirkungsnachweises stellen die Bisphosphonate zur Zeit die überlegenste Klasse von Therapeutika dar (Grauer und Raue aus (60) S. 104-117).

Diese Rattenstudie zeigt weiterhin, dass die Therapie mit Ibandronat auch eine Verbesserung der Osteointegration von Hydroxylapatit beschichteten Implantaten bei osteoporoseinduziertem Knochenverlust bewirkt.

Für die optimale Funktion einer Endoprothese ist die stabile Fixation im Knochen eine unabdingbare Voraussetzung. Besonders in Knochen, deren mechanische Kompetenz durch Vorerkrankungen wie Osteoporose reduziert ist, gestaltet sich diese Fixation problematisch. Die weiteren Reaktionen an der Grenzfläche vom Implantat zum umgebenden Gewebe entscheiden über Erfolg oder Misserfolg der sekundären Stabilität. Hierbei stellen aseptische Lockerungen und periprothetische Osteolysen gegenwärtig die häufigsten Gründe für das Versagen von Endoprothesen dar. Aufgrund ihres inhibitorischen Effekts auf die Osteoklasten sind die Bisphosphonate eine ideale Substanzgruppe, um diese Komplikationen zu behandeln, da die Effektorzelle dieser Prozesse ebenfalls der Osteoklast ist.

Hennigs et al. (48) untersuchten in ihrer klinischen Anwendungsstudie, ob durch eine orale Bisphosphonattherapie eine Prophylaxe des frühen periprothetischen Knochenschwundes möglich ist. 66 Patienten mit teilweise verminderter Knochenmineraldichte, die eine Hüfttotalendoprothese mit unzementiertem Schaft erhalten hatten, nahmen an der Studie teil. Postoperativ erhielt die 1. Gruppe 10 Wochen lang täglich 10mg Alendronat, die 2. Gruppe 5 Wochen lang täglich 20mg und die 3. Gruppe keine Therapie. Nach 12 Monaten Verlaufskontrolle mittels DXA-Messungen wurde belegt, dass der periprothetische Knochenmasseverlust durch Alendronat dosisabhängig beeinflusst und durch eine frühe, postoperative orale Therapie in verträglicher Dosierung vollständig verhindert werden kann. Die Therapie sollte sich über mindestens 10 Wochen erstrecken und mit einer Dosierung von 20mg täglich beginnen.

Aufgrund des Wirkmechanismus der Bisphosphonate ergeben sich zudem Hinweise auf eine Verbesserung der Osteointegration von Implantaten. Es ist anzunehmen, dass durch die Gabe von Bisphosphonaten mit der nachfolgenden Hemmung der Osteoklasten und einer eventuellen Aktivierung der Osteoblasten, der periprothetische Knochen schneller das Implantat integriert. So könnte eine schnellere ossäre Endoprothesenintegration und somit eine frühere Belastbarkeit erreicht werden (Kurth aus (60) S. 125-134).

Hinweise dafür liefert eine *in vitro* Studie von Shanbhag et al. (113), in der ein mitogener Effekt von Alendronat auf Osteoblasten nachgewiesen werden konnte. Alendronat wurde in verschiedenen Konzentrationen zwei unterschiedlichen Zelllinien von Osteoblasten zugesetzt und die Wirkung nach 1, 2, 3, 5 und 7 Tagen untersucht. Dabei wurde eine Stimulation der Zellproliferation um 75% gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Die Idee zu dieser Studie basierte auf den Resultaten einer vorangegangenen Hundestudie (112). Dort wurde neben der Hemmung des durch Osteoklasten verursachten Knochenabbaus festgestellt, dass eine Bis-

phosphonattherapie den Nettogewinn an Knochenmasse erhöht. Die signifikante Zunahme des eingewachsenen Knochens (>100%) konnte sich Shanbhag aber nicht allein mit der Hemmung der Osteoklastenaktivität und normaler Osteoblastenaktivität erklären, sodass er den bis dato nur vermuteten anabolen Effekt auf die Osteoblasten untersuchte (113).

In einer Hundestudie konnten Meraw et al. (74) eine Zunahme der frühen Knochenformationsrate um dentale Hydroxylapatit beschichtete Implantate und Titanimplantate, die zusätzlich mit Alendronat beschichtet waren, nachweisen. Zudem bewirkte Alendronat bei den Titanimplantaten eine signifikante Verbesserung des Knochen/Implantat Kontaktes.

Auch Pataki et al. (91) fanden anhand ihrer Rattenstudie heraus, dass die Gabe von Pamidronat und Zoledronat den Zuwachs an Knochenmasse positiv beeinflusst, was sich in einem Anstieg des trabekulären Knochens manifestierte.

Eberhardt et al. (30) untersuchten an einem Rattenmodell, ob eine postoperative Behandlung mit Ibandronat die Zeit bis zum Erreichen der Osteointegration verkürzen kann. Hierzu wurde bei 90 Tieren in beide Femora je ein Titan- und ein HA beschichtetes Titanimplantat eingebracht und die in 4 Gruppen aufgeteilten Tiere erhielten täglich subcutan 1,0, 2,5 oder 5,0µg/kg Ibandronat und NaCl 0,9%. An 13 Zeitpunkten (0-42 Tage) wurden je 2 Ratten aus einer Gruppe getötet und die Femora histologisch untersucht. Bei den HA-beschichteten Implantaten wurde eine 60%ige Osteointegration nach 37 Tagen in der Placebo-Gruppe und nach 18 Tagen in der Ibandronat Gruppe (5,0µg/kg) erreicht. Das entspricht einer Verkürzung der Osteointegrationsdauer von 51,4%. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Titanimplantate ermittelt. Diese Resultate beweisen, dass nicht nur die Knochenmenge, die im Kontakt zu den Metallimplantaten steht, erhöht werden kann, sondern auch die Zeit der Osteointegration verkürzt werden kann. Die Applikation eines Bisphosphonats nach der Implantation von zementfreien Endoprothesen kann somit die frühe Stabilität und die Überlebensrate des Implantats verbessern.

Über klinische Erfahrungen mit Bisphosphonaten in der Endoprothetik liegen bislang nur wenige Berichte vor. Aber auch in der vorliegenden Studie bewirkte Ibandronat eine deutliche Verbesserung der Osteointegration. Bereits die 1µg/kg Dosis stoppte den Knochenverlust der ovariectomierten Tiere und erhöhte die Osteointegration auf ein der sham Gruppe vergleichbares Niveau. Bei den Tieren der 4. experimentellen Gruppe war die Osteointegration durch die 25µg/kg Dosis am ausgeprägtesten.

## Diskussion

Diese Ergebnisse bestätigen, dass nicht nur die Knochenmenge, die im Kontakt zu dem Implantat steht, durch eine Bisphosphonattherapie erhöht werden kann, sondern auch die Zeit der Osteointegration verkürzt und verbessert werden kann. Somit erfolgt eine verbesserte Integration der Prothese in den Knochen und damit eine Verbesserung der Stabilität in den ersten Monaten nach der Operation. Durch die frühe Osteointegration der Prothese wird zudem die Überlebensrate der Prothese verlängert, da eine Abnahme der Abriebpartikelmigration entlang des Schaftes erreicht wird.

Als derzeit potentestes Bisphosphonat seiner Klasse bietet Ibandronat zudem den Vorteil, dass der therapeutische Einsatz sowohl oral als auch als intravenöse Injektion erfolgen kann. Dabei bietet sich die Möglichkeit, auf beiden Wegen sowohl eine kontinuierliche als auch eine intermittierende Behandlung anzuwenden, da in beiden Fällen ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden (81, 116, 122, 101). Eine Vielzahl von Studien belegt, dass eher die Gesamtdosis als das Behandlungsschema über den Therapieerfolg entscheidet (33, 10, 101). Die intermittierende orale Therapie erhöht zweifelsfrei die Compliance der Patienten, da die Einnahmenvorschriften für Bisphosphonate umständlich sind und guten Willen, Aufmerksamkeit und viel Zeit erfordern. Aber auch eine intravenöse Bolusinjektion im Abstand von 3 Monaten bietet für ambulante Patienten, bei denen die Standzeit der Endoprothese beibehalten werden soll, Erleichterung. Bei der intravenösen Applikation kommt hinzu, dass ösophageale und gastrointestinale Nebenwirkungen, wie sie bei oraler Aufnahme auftreten können, vermieden werden.

Berücksichtigt man nicht nur die Zunahme der Knochenmineraldichte sondern auch eine verbesserte Osteointegration bei osteoporotischen Knochen als Kriterium der Effektivität, liefert diese Studie den Beweis, dass Ibandronat bereits in einer Dosis von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  beide Kriterien zu erfüllen vermag. Diese Dosis ist ebenfalls geringer, als die für den gleichen Effekt benötigte Dosis von Bisphosphonaten früherer Generationen (124). Bei der Studie von Eberhardt et al. (30), in welcher der Einfluss von Ibandronat auf die Osteointegration bei nicht osteoporotischen Ratten untersucht wurde, zeigte bei der histologischen Auswertung jedoch erst die höchste Dosis von  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  eine entscheidende Verbesserung. Das lässt vermuten, dass ohne Vorschädigung des Knochens infolge einer Osteoporose eine höhere Dosis erforderlich ist, um einen signifikanten Unterschied mit den Tieren der Kontrollgruppe zu erreichen. Diese Vermutung würde mit den Ergebnissen aus der Studie von Astrand und Aspenberg (4, 5) übereinstimmen, in der bei nicht osteoporotischen Ratten nur die höchste Dosis Alendronat

## Diskussion

die Osteointegration verbesserte. Ibandronat behält jedoch selbst bei extremer Überdosierung der therapeutisch notwendigen Dosis seine Effektivität und Sicherheit bei (63).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass bei Hydroxylapatit beschichteten Implantaten im Femur von osteoporotischen Ratten bereits die klinisch therapeutische Osteoporosedosis von 1µg/kg Ibandronat eine Verbesserung der Knochenmineraldichte und Osteointegration herbeiführt. Da Veränderungen im Knochenstoffwechsel bei ovariectomierten Ratten den Folgen des Knochenverlustes im menschlichen Klimakterium weitestgehend entsprechen, ist anzunehmen, dass eine Korrelation zwischen der Relevanz der Ergebnisse im Tierversuch und der Humanpathologie besteht. Für Patienten, die an Osteoporose erkrankt sind und infolge eines Oberschenkelhalsbruchs eines künstlichen Hüftgelenkes bedürfen, würde bei einer zementfrei implantierten Prothese eine Behandlung mit Ibandronat demzufolge eine Prävention weiterer osteoporosebedingter Frakturen und eine Verbesserung der Osteointegration bedeuten. Eine Therapie mit Ibandronat könnte die Standzeit einer Endoprothese somit entscheidend verlängern.

### 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Bisphosphonates Ibandronat in der Dosis von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  und  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  auf die Knochenmineraldichte und Osteointegration bei HA beschichteten Implantaten im Femur osteoporotischer Ratten zu untersuchen. Dazu wurden 85 weibliche, 6 Monate alte Sprague-Dawley Ratten in 4 Gruppen unterteilt. In drei Gruppen waren die Tiere ovariectomiert und in der vierten Gruppe waren die Tiere sham-operiert. Allen Ratten wurde in den linken Femur ein HA beschichtetes Implantat eingebracht und zwei Tage nach diesem chirurgischen Eingriff die Therapie eingeleitet. Alle Tiere erhielten über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich eine subcutane Injektion: Die Tiere aus der sham-operierten Gruppe, sowie eine Gruppe mit ovariectomierten Tieren erhielten NaCl, und die beiden anderen ovariectomierten Gruppen erhielten jeweils eine Dosis von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  bzw.  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat. Nach Ablauf der Therapie wurden alle Tiere getötet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels DXA-Messung und die histologische Beurteilung wurde mit Hilfe des Computer Softwareprogramms Quips vorgenommen.

Die vor Beginn der Therapie durchgeführte DXA-Messung zeigte eine signifikante Abnahme der Knochenmineraldichte bei allen ovariectomierten Tieren im Vergleich zu den sham-operierten Tieren. Zwischen den drei ovariectomierten Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Knochenmineraldichte.

Die nach Ablauf der Therapie durchgeführte DXA-Messung ließ in allen Gruppen eine signifikante Zunahme der Knochenmineraldichte an den Lendenwirbelkörpern 5 und 6 erkennen. Ratten, die mit Ibandronat behandelt wurden, hatten eine signifikant höhere Knochenmineraldichte an beiden Lendenwirbelkörpern als die Ratten der ovariectomierten Kontrollgruppe. Die ovariectomierten Tiere, denen  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat appliziert wurde, zeigten im Vergleich mit der sham-operierten Gruppe eine signifikante Zunahme der Knochenmineraldichte an Lendenwirbelkörper 6, jedoch nicht an Lendenwirbelkörper 5. Die Therapie mit  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat bewirkte eine Erhöhung der Knochenmineraldichte auf das Niveau der sham-operierten Tiere. Die Unterschiede zwischen den beiden Ibandronat Gruppen, im Hinblick auf die Veränderungen der Knochenmineraldichte, waren hingegen statistisch nicht signifikant.

## Zusammenfassung

Die histologische Auswertung ergab eine osteointegrierte Oberfläche von  $54,5 \pm 25,5\%$  in der sham-operierten Gruppe, gegenüber  $23,7 \pm 18,6\%$  in der ovariectomierten Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die mit  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat therapiert wurden, lag die osteointegrierte Oberfläche bei  $50,6 \pm 24,4\%$  und bei den Tieren, die mit  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat therapiert wurden, lag die osteointegrierte Oberfläche bei  $67,6 \pm 26,8\%$ . Somit war die osteointegrierte Oberfläche der ovariectomierten Tiere, die  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  und  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat erhielten,  $113,5\%$  und  $185,5\%$  höher als die der ovariectomierten Kontrollgruppe. Die osteointegrierte Oberfläche der ovariectomierten Kontrollgruppe war wiederum um  $56,5\%$  geringer als die der sham-operierten Gruppe. Die Unterschiede im Hinblick auf die osteointegrierte Oberfläche, zwischen den mit Ibandronat behandelten Gruppen, und diesen im Vergleich zu der sham-operierten Gruppe, waren hingegen statistisch nicht signifikant.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bereits eine geringe Dosis von  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  Ibandronat die Knochenmineraldichte und Osteointegration in osteoporotischem Knochen entscheidend verbessern kann. Es ist daher anzunehmen, dass eine Therapie mit Ibandronat osteoporosebedingten Frakturen vorbeugt und die ossäre Endoprothesenintegration fördert. Klinische Studien an Menschen, die an Osteoporose erkrankt sind und eines künstlichen Hüftgelenks bedürfen, werden zeigen, ob sich diese Schlussfolgerungen bestätigen.

### 7 Summary

The purpose of the present study was to investigate the influence of the bisphosphonate ibandronate in the doses of  $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  and  $25\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  on vertebral bone mineral density and osseointegration of HA coated implants in the femur of osteoporotic rats. For that purpose 85 female 6 months old Sprague-Dawley rats were divided in 4 groups. In three groups the animals were ovariectomized and in the fourth group the animals were sham-operated. All rats received a HA coated implant in the left femur and two days after this surgery the therapy was induced. All animals received for a period of 21 days daily a subcutaneous injection: The animals of the sham-operated group as one group with ovariectomized animals received NaCl and the other both ovariectomized groups respectively received a dose of  $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  or  $25\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  ibandronate. At the end of the therapy all animals were killed. For densitometric evaluation DXA-measurement were done and the histomorphometric assessment was performed using the software program Quips.

The DXA-measurement performed before the beginning of the therapy indicated a significant decrease of bone mineral density in all ovariectomized animals compared to the sham-operated animals. There was no significant difference among the three ovariectomized groups in with regard to bone mineral density.

The DXA-measurement performed at the end of the therapy let recognize in all groups a significant increase of bone mineral density at the lumbar vertebrae 5 and 6. Rats which were treated with ibandronate had a significant higher bone mineral density at both lumbar vertebrae than the rats in the ovariectomized control group. The ovariectomized animals treated with  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate showed a significant increase of bone mineral density in the lumbar vertebrae 6 compared with the sham-operated group. The therapy with  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate caused an increase of bone mineral density to the level of the sham-operated animals. However the differences between the two ibandronate groups with regard to the changes in bone mineral density were not statistically significant.

## Summary

The histological evaluation yielded a osseointegrated surface of  $54,5\pm 25,5\%$  in the sham-operated group opposite  $23,7\pm 18,6\%$  in the ovariectomized control group. In the animals which were treated with  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate the osseointegrated surface layed at  $50,6\pm 24,4\%$  and in the animals which were treated with  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate the osseointegrated surface layed at  $67,6\pm 26,8\%$ . Consequently the osseointegrated surface in the ovariectomized animals which received  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  and  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate was 113,5% and 185,5% higher than that in the ovariectomized control group. In turn the osseointegrated surface in the ovariectomized control group was 56,5% lower than that in the sham-operated group. However, the differences in osseointegrated surface between the groups treated with ibandronate and the sham-operated control group were not significant.

The results of the present study show that a low dose of  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  ibandronate can improve the bone mineral density and osseointegration of metal implants in osteoporotic bone. This suggests that an ibandronate therapy not only prevents osteoporotic-related fractures but promotes the osseous integration of an endoprosthesis. Further clinical investigations are necessary to clarify these effects in humans bearing an osteoporosis and needd a total joint replacement for severe joint arthritis.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) **Adami S, Delmas P, Felsenberg D, Christiansen C, Robinson J, Coutant K, Meinert R, Schimmer R, von Stein T**  
Three-monthly 2mg intravenous ibandronate bolus injections significantly increase bone mineral density in women with postmenopausal osteoporosis  
J Bone Miner Res 2002; 17 Suppl 1: S472
- (2) **Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Shigematsu T, Slosman D, Bonjour J**  
Effects of the bisphosphonate Tiludronate on bone resorption, calcium balance, and bone mineral density  
J Bone Miner Res 1993; 8(12): 1491-1498
- (3) **Ammann P, Rizzoli R, Slosman D, Bonjour J**  
Sequential and precise in vivo measurement of bone mineral density in rats using dual-energy x-ray absorptiometry.  
J Bone Miner Res 1992; 7(3): 311-316
- (4) **Astrand J, Aspenberg P**  
Alendronate did not inhibit instability-induced bone resorption. A study in rats  
Acta Orthop Scand 1999; 70(1): 67-70
- (5) **Astrand J, Aspenberg P**  
Reduction of instability-induced bone resorption using bisphosphonates: high doses are needed in rats.  
Acta Orthop Scand 2002; 73(1): 24-30
- (6) **Baier R, Meyer A, Natiella J, Natiella R, Carter J**  
Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results  
J Biomed Mater Res 1984; 18: 327-355

- (7) **Bauer T, Schils J**  
The pathology of total joint arthroplasty  
I. Mechanisms of implant fixation  
Skeletal Radiology 1999; 28: 423-432
- (8) **Bauer T, Schils J**  
The pathology of total joint arthroplasty  
II. Mechanisms of implant failure  
Skeletal Radiology 1999; 28: 483-497
- (9) **Bauss F, Mühlbauer R**  
BM 21.0955, Mononatriumsalz, Monohydrat.  
Drugs of the future 1994; 19(1): 13-16
- (10) **Bauss F, Lalla S, Ende R, Hothorn L**  
Effects of treatment with ibandronate on bone mass, architecture, biomechanical properties, and bone concentration of ibandronate in ovariectomized aged rats  
J Rheumatol 2002; 29(10): 2200-2208
- (11) **Bauss F**  
Ibandronate in malignant bone diseases and osteoporosis – Preclinical results  
Onkologie 1997; 20: 204-208
- (12) **Boonen S, Vanderschueren D, Cheng XG, Verbeke G, Dequeker J, Geusens P, Broos P, Bouillon R**  
Age-related (type II) femoral neck osteoporosis in men:  
Biochemical evidence for both hypovitaminosis D- and androgen deficiency-induced bone resorption.  
J Bone Miner Res 1997; 12(12): 2119-2126
- (13) **Bragdon C, Biggs S, Wintle S, Jasty M, Rubash H, Harris W**  
Inhibition of disuse osteopenia around a canine thr under the influence of alendronate  
Proc Orthopaedic Research Society, Orlando 2000; P 0137

- (14) **Branemark P**  
Osseointegration and its experimental background.  
J Prosthet Dent 1983; 50: 399-410
- (15) **Breusch S, Aldinger P, Thomsen M, Ewerbeck V, Lukoschek M**  
Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik  
Teil I: Prothesenstiel  
Unfallchirurg 2000; 103(11): 918-931
- (16) **Bucher O, Wartenberg H**  
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen  
Verlag Hans Huber, Bern·Göttingen·Toronto·Seattle; 1997; E. Knochengewebe
- (17) **Chang Y, Lew D, Park J, Keller J**  
Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with  
varying crystallinity.  
J Oral Maxillofac Surg 1999; 57(9): 1096-1108
- (18) **Conference, N.C.D.**  
NIH Consensus Development Conference:  
Diagnosis, Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis  
Am J Med 1993; 94: pp. 646-650
- (19) **Crandall C**  
Parathyroid hormone for treatment of osteoporosis.  
Arch Intern Med; 2002; 162(20): 2297-2309
- (20) **Cummings S, Black D, Thompson D, Applegate W, Barrett-Connor E,  
Musliner T, Palermo L, Prineas R, Rubin S, Scott J, Vogt T, Wallace R, Yates A,  
La Croix A**  
Effect of alendronate on risk of fracture in woman with low bone density but without  
vertebral fractures: Results from the Fracture Intervention Trial.  
JAMA 1998; 280(24): 2077-2082

- (21) **Dämmrich K**  
Ein Beitrag zur Osteoporose endokrinen Ursprungs beim Hund  
BMTW 1959; 17(59): 340-343
- (22) **Dämmrich K**  
Osteoporose bei erwachsenen Tieren  
DTW 1967; 74(6): 138-142
- (23) **Dämmrich K**  
Osteoporose bei Jungtieren  
Path Vet 1967; 4(5): 435-463
- (24) **Dahme E, Weiss E**  
Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 4. Auflage, 1988  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- (25) **D'Antonio J, Capello W, Manley M**  
Remodeling of bone around hydroxyapatite-coated femoral stems.  
J Bone Joint Surg Am 1996; 78(8): 1226-1234
- (26) **Dawson-Hughes B**  
Calcium and vitamin D nutritional needs of elderly women.  
J Nutr 1996; 126 Suppl 4: S1165-1167
- (27) **Delmas P**  
Do we need to change the WHO definition of osteoporosis?  
Osteoporos Int 2000; 11: 189-191
- (28) **Delmas P, Skag A, Chesnut C, Stakkestad J, Christiansen C, Hoiseth A, Benevolenskaya L, Recker R, Leishman B, Mahoney P, Schimmer R**  
Upper gastrointestinal safety profile of oral daily and intermittent ibandronate: results from a large pivotal phase III study  
Osteoporos Int 2002; 13 Suppl 3: S15

- (29) **Dooley M, Balfour J**  
Ibandronate.  
Drugs 1999; 57(1): 101-108; discussion 109-110
- (30) **Eberhardt C, Sayer J, Grüner E, Schwarz M, Bauss F, Kurth A**  
Ibandronate reduces the time of implant osseointegration in a rat model  
Bone 2002; 30(3) Suppl: S40
- (31) **Fleisch H**  
Bisphosphonate bei Knochenerkrankungen; Vom Labor zum Patienten  
Verlag Hans Huber, Bern·Göttingen·Toronto·Seattle; 1997
- (32) **Fleisch H**  
Bisphosphonates in Bone Disease; From the Laboratory to the Patient  
Academic Press, San Diego·San Francisco·New York·Boston·London·Sydney·Tokyo;  
2000
- (33) **Fleisch H**  
The bisphosphonate ibandronate, given daily as well as discontinuously, decreases bone resorption and increases calcium retention as assessed by <sup>45</sup>Ca kinetics in the intact rat.  
Osteoporos Int 1996; 6(2): 166-170
- (34) **Frenkel S, Jaffe W, Della Valle C, Jazrawi L, Maurer S, Baitner A, Wright K, Sala D, Hawkins M, Di Cesare P**  
The effect of alendronate (Fosamax<sup>TM</sup>) and implant surface on bone integration and remodeling in a canine model  
J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 2001; 58: 645-650
- (35) **Freudiger U, Grünbaum E, Schimke E**  
Klinik der Hundekrankheiten, 2. Auflage, 1993  
Gustav Fischer Verlag Jena·Stuttgart

- (36) **Friedberg K, Rüfer R**  
Therapie von Knochenerkrankungen mit Bisphosphonaten  
Gustav Fischer, Stuttgart·Jena·New York; 1993
- (37) **Frost H, Jee W**  
On the rat model of human osteopenias and osteoporoses.  
Bone Miner 1992; 18(3): 227-236
- (38) **Gala Paniagua J, Diaz-Curiel M, De la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo Garcia M**  
Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry  
The British Journal of Radiology 1998; 71: 754-758
- (39) **Goldhahn J**  
Funktionelle Oberflächen für die Medizintechnik; Lokale in-vivo-Reaktionen an Grenzflächen zu Implantaten  
3. Thüringer Biomaterial-Kolloquium und 3. Workshop der FDS-Themenreihe;  
Jena, 9. November 2001
- (40) **Goldhahn J, Villinger N**  
Where does wear debris go? Target identification in a rabbit model  
J Bone Joint Surg 2001; 53-A
- (41) **Gondolph-Zink B**  
Der Einfluss der Hydroxylapatitbeschichtung auf die Osteointegration belasteter und unbelasteter Implantate  
Orthopäde 1998; 27(2): 96-104
- (42) **Green J**  
Renal tolerability profile of novel, potent bisphosphonates in two short-term rat models.  
Pharmacol Toxicol 1997; 80: 225-230

- (43) **Gregg E, Cauley J, Seeley D, Ensrud K, Bauer D**  
Physical activity and osteoporotic fracture risk in older women  
Study of Osteoporotic Fractures Research Group.  
Ann Intern Med 1998; 129(2): 81-88
- (44) **Grotz W, Nagel C, Poeschel D, Cybulla M, Petersen K, Uhl M, Strey C, Kirste G, Olschewski M, Reichelt A, Rump L**  
Effect of ibandronate on bone loss and renal function after kidney transplantation  
J Am Soc Nephrol 2001; 12: 1530-1537
- (45) **Haugenauer D, Welch V, Shea B, Tugwell P, Wells G**  
Fluoride for treating postmenopausal osteoporosis.  
Cochrane Database Syst Rev 2000; (4): CD002825
- (46) **Hara T, Hayashi K, Nakashima Y, Kanemaru T, Iwamoto Y**  
The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats.  
J Bone Joint Surg Br 1999; 81(4): 705-709
- (47) **Harris S**  
Bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis:  
Clinical studies of etidronate and alendronate  
Osteoporos Int 2001; 12 Suppl 3: S11-16
- (48) **Hennigs T, Arabmotlagh M, Schwarz A, Zichner L**  
Dosisabhängige Prophylaxe des frühen periprothetischen Knochenschwundes durch Alendronat  
Z Orthop Ihre Grenzgeb 2002; 140(1): 42-47
- (49) **Hildebrand G, Liefeth K, Neumann H**  
Quantitative Analyse des Degradationsverhaltens verschiedener Ca/P-Schichten in simulierter Körperflüssigkeit  
Medizintechnik-Workshop in Tübingen, 14.-15.05.1998

- (50) **Hiroi-Furuya E**  
Etidronate inhibits osteoclastic bone resorption, promotes apoptosis and disrupts actin rings in isolated mature osteoclasts.  
Calcif Tissue International 1999; 64: 219-223
- (51) **Holmes D**  
Clinical laboratory animal medicine  
Iowa State University Press; 1984
- (52) **Itoh, F, Shiraki, M, Komatsu H, Imai Y, Komatsu Y, Taya F, Kojima M**  
Treatment effects of bisphosphonates on ovariectomy-induced osteopenia in rats:  
Comparison between clodronate and etidronate  
J Bone Miner Metab 1999; 17(4): 252-258
- (53) **Jones T, Hunt R, King N**  
Veterinary pathology, Sixth Edition, 1997  
Williams & Wilkins, Baltimore·Philadelphia·London·Paris·Bangkok·Buenos Aires
- (54) **Jubb K, Kennedy P, Palmer N**  
Pathology of Domestic Animals, Fourth Edition, Volume 1, 1993  
Academic Press, Inc., San Diego·New York·Boston·London·Sydney·Tokyo·Toronto
- (55) **Junqueira L, Carneiro J**  
Histologie, Kapitel 10, Knochen und Knochenverbindungen  
Springer Verlag Berlin·Heidelberg·New York; 1995
- (56) **Kalu D**  
The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss.  
Bone Miner 1991; 15(3): 175-191
- (57) **Kanis J and Glüer C**  
An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry.  
Osteoporos Int 2000; 11: 192-202

- (58) **Kemmler W, Engelke K, Weineck J, Hensen J, Kalender W**  
The Erlangen Fitness Osteoporosis Prevention Study: a controlled exercise trial in early postmenopausal women with low bone density-first-year results.  
Arch Phys Med Rehabil 2003; 84(5): 673-682
- (59) **Kudlacek S, Leidig-Bruckner G, Scharla S, Pfeilschifter J, Kruse H, Keck E, Willvonseder R**  
Zur Prävention der Osteoporose  
Dtsch Med Wochenschr 2001; 126(27): 793-797
- (60) **Kurth A, Hovy L, Hennigs T**  
Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen  
Steinkopff Verlag Darmstadt; 2001
- (61) **Kurth A, Kim S, Sedlmeyer I, Bauss F, Shea M**  
Ibandronate treatment decreases the effects of tumor-associated lesions on bone density and strength in the rat.  
Bone 2002; 30(1): 300-306
- (62) **Kurth A, Kim S, Sedlmeyer I, Hovy L, Bauss F**  
Treatment with ibandronate preserves bone in experimental tumour-induced bone loss  
J Bone Joint Surg (Br) 2000; 82-B: 126-130
- (63) **Lalla S, Hothorn L, Haag N, Bader R, Bauss F**  
Lifelong administration of high doses of ibandronate increases bone mass and maintains bone quality of lumbar vertebrae in rats  
Osteoporos Int 1998; 8: 97-103
- (64) **Laupacis A**  
The effect of elective total hip replacement on health-related quality of life.  
J Bone Joint Surg Am 1993; 75: 1619-1626

- (65) **Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K**  
Anatomie des Menschen; Band 1; Bewegungsapparat  
Georg Thieme Verlag Stuttgart·New York; 1987
- (66) **Li X, Jee W, Ke H, Mori S, Akamine T**  
Age-related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats.  
Cells Mater 1991; Suppl 1: 25-35
- (67) **Lind M**  
Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation.  
Acta Orthop Scand Suppl 1998; 283: 2-37
- (68) **Lind M, Overgaard S, Ongpipattanakul B, Nguyen T, Bunger C, Soballe K**  
Transforming growth factor-beta 1 stimulates bone ongrowth to weight-loaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs.  
J Bone Joint Surg Br 1996; 78(3): 377-382
- (69) **Luckman S, Hughes D, Coxon F, Russell R, Rogers M**  
Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent posttranslational prenylation of GTP-binding proteins  
J Bone Miner Res 1998; 13(4): 581-589
- (70) **Lugero G, de Falco Caparbo V, Guzzo M, König B, Jorgetti V**  
Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits.  
Implant Dent 2000; 9(4): 303-309
- (71) **Lyubimova N, Kushlinsky N, Lichinitser M, Schlosser K**  
Renal safety of intravenous ibandronic acid in breast cancer patients with metastatic bone disease  
Clin Drug Invest 2003; 23(11): 707-716

- (72) **Manninger R, Mócsy J**  
Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, Zehnte Auflage, Zweiter Band, 1954  
Veb Gustav Fischer Verlag, Jena
- (73) **Mark S, Link H**  
Round Table Discussion  
Reducing osteoporosis: prevention during childhood and adolescence  
Bulletin of the World Health Organization 1999; 77(5): 423-435
- (74) **Meraw S, Reeve C, Wollan P**  
Use of alendronate in peri-implant defect regeneration  
J Periodontol 1999; 70: 151-158
- (75) **Miller S, Bowmann B, Jee W**  
Available animal models of osteopenia -- small and large  
Bone 1995; 17 Suppl 4: S117-123
- (76) **Millett P, Allen M, Bostrom M**  
Effects of Alendronate on Particle-Induced Osteolysis in a Rat Model  
J Bone Joint Surg Am 2002; 84-A(2): 236-249
- (77) **Minne H, Pfeifer M, Begerow B, Pollähne W**  
Osteoporose  
Orthopäde 2002; 31: 681-699
- (78) **Mochida Y, Bauer T, Akisue T, Brown P**  
Alendronate does not inhibit early bone apposition to hydroxyapatite-coated total joint implants: a preliminary study.  
J Bone Joint Surg Am 2002; 84-A(2): 226-235
- (79) **Mockwitz J, Dathe V**  
Ergebnisse nach zementfrei implantierten Femurschaftendoprothesen vom Modell  
Hofheim nach einer Laufzeit von 10 Jahren  
Orthopädische Praxis 38, 4 (2002) 260-267

- (80) **Monier-Faugere M, Friedler R, Bauss F, Malluche H**  
A new bisphosphonate, BM 21.0955, prevents bone loss associated with cessation of ovarian function in experimental dogs.  
J Bone Miner Res 1993; 8(11): 1345-1355
- (81) **Monier-Faugere M, Geng Z, Paschalis P, Qi Q, Arnala I, Bauss F, Boskey A, Malluche H**  
Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs:  
Effects on bone morphometry and mineral properties  
J Bone Miner Res 1999; 14(10): 1768-1778
- (82) **Motohashi M, Shiota T, Tokugawa Y, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A**  
Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats.  
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 87(2): 145-152
- (83) **Mühlbauer R, 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 1991; 6: 1003-1011
- (84) **Narai S, Nagahata S**  
Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis.  
Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18(2): 218-223
- (85) **Netter F**  
Farbatlanten der Medizin; Band 7; Bewegungsapparat I  
Georg Thieme Verlag Stuttgart·New York; 1992
- (86) **Nyland A**  
Spritztechnische Herstellung und Charakterisierung bioaktiver Schichten für die Endoprothetik  
Mainz, G; 1998

- (87) **Olmstead M**  
Canine cemented total hip replacements: state of the art.  
J Small Anim Pract 1995; 36(9): 395-399
- (88) **Overgaard S, Bromose U, Lind M, Bunger C, Soballe K**  
The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants.  
Mechanical and histomorphometric results.  
J Bone Joint Surg Br 1999; 81(4): 725-731
- (89) **Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K**  
Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants  
in the tibia of mature rats.  
J Oral Maxillofac Surg 2000; 58(8): 877-882
- (90) **Papapoulos S**  
Ibandronate: A potent new bisphosphonate in the management of postmenopausal  
osteoporosis.  
Int J Clin Pract 2003; 57(5): 417-422
- (91) **Pataki A, Müller K, Green J, Ma Y, Li Q, Jee W**  
Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate  
on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed  
before, during, and after treatment.  
Anat Rec 1997; 249(4): 458-468
- (92) **Peruche B, Schulz M**  
Alendronat, Ibandronat, Risedronat und Tiludronat, vier neue Bisphosphonate  
Pharmazeutische-Zeitung 2001; Ausgabe 17; Pharmazie

- (93) **Pfeilschifter J, Scheidt-Nave C, Baum E, Dören M, Hadji P, Keck E, Minne H, Pientka L, Götte S, Kruse H, Lüttje D, Ringe J, Mittermayer V, Müller V, Albert J, Allolio B, Blind E, Böhming W, Danielzik S, Dreher R, Eidner T, Hein H, Müller M, Reinshagen M, Raspe H**  
Die DVO-Leitlinien zur Osteoporose  
Osteologie 2003, Band 12, Heft 2, S53-128
- (94) **Pfeilschifter J, Minne H, Enzmann E, Krempien B, Ziegler R**  
Inflammation-mediated osteopenia in the rat: the effects of artificial granuloma and sham operation on cortical and trabecular bone.  
Bone 1985; 6(6): 461-465
- (95) **Pilliar R**  
Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants.  
Clin Orthop 1986; 208: 108-113
- (96) **Potel K**  
Lehrbuch der Pathologischen Physiologie der Haustiere  
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1969
- (97) **Ravn P, Neugebauer G, Christiansen C**  
Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis.  
Bone 2002; 30(1): 320-324
- (98) **Ravn P**  
Bisphosphonates for prevention of postmenopausal osteoporosis.  
Dan Med Bull 2002; 49(1): 1-18

- (99) **Ravn P, Clemmesen B, Riis B, Christiansen C**  
The effect on bone mass and bone markers of different doses of ibandronate:  
A new bisphosphonate for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis:  
A 1-year, randomized, double-blind, placebo-controlled dose-finding study.  
Bone 1996; 19(5): 527-533
- (100) **Recker R**  
Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation  
CRC Press Florida; 1983
- (101) **Riis B, Ise J, von Stein T, Bagger Y, Christiansen C**  
Ibandronate: A comparison of oral daily dosing versus intermittent dosing in  
postmenopausal osteoporosis  
J Bone Miner Res 2001; 16(10): 1871-1878
- (102) **Roche Reg. Ltd. Hertfordshire U.K.**  
Bondronat<sup>®</sup>; Fachinformation; November 2003
- (103) **Rogers M, Gordon S, Benford H, Coxon F, Luckman S, Monkkonen J, Frith J**  
Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates  
Cancer 2000; 88: 2961-2978
- (104) **Romeis, B**  
Mikroskopische Technik  
Urban & Schwarzenberg, München·Wien·Baltimore; 1989; S. 549-553 und 499-500
- (105) **Rosen H, Middlebrooks V, Sullivan E, Rosenblatt M, Maitland M, Moses A,  
Greenspan S**  
Subregion analysis of the rat femur: a sensitive indicator of changes in bone density  
following treatment with thyroid hormone or bisphosphonates.  
Calcif Tissue Int 1994; 55(3): 173-175

- (106) **Russell R, Rogers M**  
Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again  
Bone 1999; 25(1): 97-106
- (107) **Russell R, Croucher P, Rogers M**  
Bisphosphonates: Pharmacology, Mechanisms of Action and Clinical Uses  
Osteoporos Int 1999; Suppl 2: S66-80
- (108) **Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray D, Athanasou N**  
Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption  
Ann Rheum Dis 1998; 57: 614-618
- (109) **Sahni M, Guenther H, Fleisch H, Collin P, Martin T**  
Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts  
J Clin Investigation 1993; 91(5): 2004-2011
- (110) **Seeliger F, Leeb T, Peters M, Brugmann M, Fehr M, Hewicker-Trautwein M**  
Osteogenesis imperfecta in two litters of dachshunds.  
Vet Pathol 2003; 40(5): 530-539
- (111) **Shanbhag A, Rubash H**  
Bisphosphonate therapy for the prevention of osteolysis in total joint replacements  
Current Opinion in Orthopedics 1998; 9(6): 81-87
- (112) **Shanbhag A, Hasselman C, Rubash H**  
Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model  
Clin Orthop 1997; 344: 33-43
- (113) **Shanbhag A, Kenney J, Manning C, Flannery M, Rubash H, Goldring S**  
Mitogenic effect of bisphosphonates on osteoblastic cells  
Proc Orthopaedic Research Society Orlando 2000, P 0688

- (114) **Skripitz R, Aspenberg P**  
Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation.  
Clin Orthop 2001; 392: 427-432
- (115) **Skripitz R, Aspenberg P**  
Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone.  
J Bone Joint Surg Br 2001; 83(3): 437-440
- (116) **Smith S, Recker R, Hannan M, Müller R, Bauss F**  
Intermittent intravenous administration of the bisphosphonate ibandronate prevents bone loss and maintains bone strength and quality in ovariectomized cynomolgus monkeys.  
Bone 2003; 32: 45-55
- (117) **Søballe K, Hansen E, Brockstedt-Rasmussen H, Bünger C**  
The effects of osteoporosis, bone deficiency, bone grafting and micromotion on fixation of porous-coated hydroxyapatite-coated implants, in Hydroxyapatite Coatings in Orthopaedic Surgery.  
R.G.T. Geesink and M.T Manley (eds.), New York: Raven Press 1993; pp107-136
- (118) **Steinemann G**  
Wechselwirkungen zwischen Implantat und Knochen.  
In: Rahmanzadeh R, Faensen M (Hrsg) Hüftgelenksendoprothetik.  
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1984; S123-130
- (119) **Stünzi H, Weiss E**  
Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin, 8. Auflage  
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, 1990
- (120) **Szmukler-Moncler S, Zeggel P, Perrin D, Bernard J, Neumann H**  
Histological evaluation of a fully resorbable calcium phosphate coating obtained by electrochemical deposition. Experimental studies and human biopsies  
Actualités en Biomatériaux, Vol 6, Editions Romillat, Paris, pp185-203

- (121) **Teitelbaum S, Tondravi M, Ross F**  
Osteoclast biology.  
Academic Press San Diego·New York·Boston·London·Sydney·Tokyo·Toronto  
1996; 3: 61-65
- (122) **Thiébaud D, Burckhardt P, Kriegbaum H, Huss H, Mulder H, Juttmann J, Schöter K**  
Three monthly intravenous injections of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis.  
Am J Med 1997; 103(4): 298-307
- (123) **Thompson D, Simmons H, Pirie C, Ke H**  
FDA Guidelines and animal models for osteoporosis.  
Bone 1995; 17 Suppl 4: S125-133
- (124) **Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, Yamaguchi A**  
Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement titanium implants in tibiae of ovariectomized rats.  
Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18(1): 66-74
- (125) **van Beek**  
Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates; 1999  
Biochem Biophys Res Commun, 264, 108-111
- (126) **Vitté C**  
Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption.  
Endocrinology 1996; 137: 2324-2333
- (127) **Wang X, Shanbhag A, Rubash H, Agrawal C**  
Short-term effects of bisphosphonates on the biomechanical properties of canine bone.  
J Biomed Mater Res 1999; 44(4): 456-460

- (128) **Watts N**  
Risedronate for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis:  
Results from recent clinical trials.  
Osteoporos Int 2001; 12 Suppl 3: S17-22
- (129) **Willert H, Buchhorn G**  
Osseointegration of cemented and noncemented implants in artificial hip replacement:  
Long-term findings in man.  
J Long Term Eff Med Implants 1999; 9(1-2): 113-130
- (130) **World Health Organization**  
Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal  
osteoporosis.  
WHO Technical Report Series 843. WHO, Genève; 1994
- (131) **World Health Organization**  
Guidelines for the preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis.  
WHO, Genève; 1998
- (132) **Wronski T, Yen C**  
The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss.  
Cells and Materials 1991; Suppl 1: 69-74
- (133) **Zeggel P**  
Bioactive Calcium Phosphate Coatings for Dental Implants.  
Int mag of oral implantology 2000; 1: 52-57

# Anhang

## 9 Anhang

### 9.1. Tabellen

#### 9.1.1. Gewichtsveränderungen

sham		ovx		Ib 1 $\mu$ g		Ib 25 $\mu$ g	
1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
320	270	330	320	300	300	330	340
280	280	310	315	300	300	300	330
260	250	310	315	310	300	320	330
280	305	300	300	290	300	370	375
280	270	340	340	310	330	300	280
270	275	310	310	280	320	300	310
280	300	310	300	310	320	320	330
290	290	330	350	330	320	300	290
330	355	320	330	300	300	310	295
250		330	320	330	320	350	330
300	290	320	330	320	325	300	300
240	250	300	305	350	345	270	275
310	320	320	310	280	300	340	330
280	270	330	265	340	340	310	310
350	315	350	355	330	310	320	325
290	280	310	325	300		330	350
400	370	310	300	340	315	350	340
340	330	320	320	310	310	310	320
280	270	300	290	270	325	350	335
		340	320			310	315
		340	330			260	255
		390	355				
		360	330				
		370	345				
<b>MW: 297,22</b>	<b>MW: 293,33</b>	<b>MW: 327,08</b>	<b>MW: 320</b>	<b>MW: 310,52</b>	<b>MW: 314,73</b>	<b>MW: 316,66</b>	<b>MW: 317,38</b>
<b>SD: 38,32</b>	<b>SD: 33,45</b>	<b>SD: 22,93</b>	<b>SD: 21,26</b>	<b>SD: 22,22</b>	<b>SD: 14,23</b>	<b>SD: 26,52</b>	<b>SD: 27,68</b>

Tab. 7: Gewichtsveränderungen der einzelnen Tiere in g vor Beginn der Studie (1. Messung) und nach der Therapie (2. Messung)

## Anhang

### 9.1.2. Unterschiede bezüglich der Knochenmineraldichte

#### 9.1.2.1. Sham

<b>Gruppe</b>	<b>M1 von L6</b>	<b>M2 von L6</b>	<b>M1 von L5</b>	<b>M2 von L5</b>
sham	0,1979	0,1450	0,1979	0,1744
sham	0,1871	0,2436	0,2015	0,2674
sham	0,2034	0,2812	0,2263	0,2996
sham	0,2010	0,2357	0,2073	0,2647
sham	0,2267	0,2147	0,2292	0,2466
sham	0,1919		0,1971	
sham	0,1610	0,1749	0,1967	0,2031
sham	0,1898	0,2925	0,1981	0,2604
sham	0,1725	0,2353	0,1790	0,2713
sham	0,1784	0,2698	0,2173	0,2761
sham	0,1754	0,2522	0,2018	0,2517
sham	0,1571	0,2180	0,1824	0,2362
sham	0,1873	0,2526	0,2173	0,2857
sham	0,1818	0,2508	0,1843	0,2604
sham	0,2362	0,1905	0,2256	0,1925
sham	0,1805	0,2485	0,2107	0,2572
sham	0,2146	0,2350	0,2698	0,2557
sham	0,2450		0,2348	
sham	0,2510	0,2125	0,2245	0,2345
<b>MW:</b>	<b>0,1968</b>	<b>0,2325</b>	<b>0,2106</b>	<b>0,2493</b>
<b>SD:</b>	<b>0,0269</b>	<b>0,0375</b>	<b>0,0217</b>	<b>0,0329</b>

Tab. 8: DXA-Ergebnisse aller Tiere aus der 1. experimentellen Gruppe gemessen an Lendenwirbelkörper (L) 5 und 6 bei der Messung (M) vor Therapiebeginn (1) und nach Therapieende (2) in mg/cm<sup>2</sup>

## Anhang

### 9.1.2.2. OVX

Gruppe	M1 von L6	M2 von L6	M1 von L5	M2 von L5
OVX	0,1493	0,2646	0,1815	0,2523
OVX	0,1490	0,2263	0,1737	0,2201
OVX	0,1505	0,2221	0,1629	0,2117
OVX	0,1575	0,2054	0,1630	0,2382
OVX	0,1515	0,2122	0,1863	0,2496
OVX	0,1598	0,2326	0,1926	0,2237
OVX	0,1563	0,2223	0,1838	0,1230
OVX	0,1380	0,2455	0,1615	0,2279
OVX	0,1416	0,2561	0,1681	0,2629
OVX	0,1562	0,2140	0,1680	0,1994
OVX	0,1268	0,2206	0,1509	0,2398
OVX	0,1678	0,2044	0,1902	0,2354
OVX	0,1539	0,2214	0,1691	0,2314
OVX	0,1662	0,2070	0,1831	0,2279
OVX	0,1495	0,2255	0,1729	0,2506
OVX	0,1484	0,2554	0,1944	0,2430
OVX	0,1518	0,2232	0,1654	0,2000
OVX	0,1525	0,2077	0,1668	0,2158
OVX	0,1546	0,2546	0,1781	0,2447
OVX	0,1513	0,2224	0,1749	0,2183
OVX	0,2474	0,2484	0,2596	0,2501
OVX	0,2520	0,2213	0,2326	0,2220
OVX	0,2633	0,2233	0,2555	0,2159
OVX	0,2420	0,2420	0,2752	0,2245
<b>MW:</b>	<b>0,1682</b>	<b>0,2283</b>	<b>0,1879</b>	<b>0,2262</b>
<b>SD:</b>	<b>0,0389</b>	<b>0,0176</b>	<b>0,0333</b>	<b>0,0275</b>

Tab. 9: DXA-Ergebnisse aller Tiere aus der 2. experimentellen Gruppe gemessen an Lendenwirbelkörper (L) 5 und 6 bei der Messung (M) vor Therapiebeginn (1) und nach Therapieende (2) in mg/cm<sup>2</sup>

## Anhang

### 9.1.2.3. Ibandronat 1µg

Gruppe	M1 von L6	M2 von L6	M1 von L5	M2 von L5
Ib 1µg	0,1770	0,2675	0,2054	0,2735
Ib 1µg	0,1684	0,2654	0,1942	0,2567
Ib 1µg	0,1586	0,2203	0,1730	0,1925
Ib 1µg	0,1676	0,2465	0,1735	0,2439
Ib 1µg	0,1763	0,2364	0,1841	0,2662
Ib 1µg	0,1977	0,2721	0,2032	0,2672
Ib 1µg	0,1935	0,2500	0,2074	0,2701
Ib 1µg	0,1734	0,2315	0,1979	0,2395
Ib 1µg	0,1695	0,2601	0,1655	0,2677
Ib 1µg	0,1813	0,2472	0,2004	0,2516
Ib 1µg	0,1783	0,2774	0,1907	0,2875
Ib 1µg	0,1716	0,2734	0,2091	0,2799
Ib 1µg	0,1701	0,2780	0,2026	0,2666
Ib 1µg	0,1877	0,2708	0,2075	0,2610
Ib 1µg	0,1744	0,2613	0,1857	0,2709
Ib 1µg	0,1579	0,2275	0,1725	0,2527
Ib 1µg	0,1767	0,2292	0,1794	0,2410
Ib 1µg	0,1744		0,1886	
Ib 1µg	0,1789	0,2496	0,1972	0,2302
Ib 1µg	0,1633	0,2317	0,1836	0,2243
<b>MW:</b>	<b>0,1748</b>	<b>0,2524</b>	<b>0,1911</b>	<b>0,2549</b>
<b>SD:</b>	<b>0,0101</b>	<b>0,0126</b>	<b>0,0134</b>	<b>0,0225</b>

Tab. 10: DXA-Ergebnisse aller Tiere aus der 3. experimentellen Gruppe gemessen an Lendenwirbelkörper (L) 5 und 6 bei der Messung (M) vor Therapiebeginn (1) und nach Therapieende (2) in mg/cm<sup>2</sup>

## Anhang

### 9.1.2.4. Ibandronat 25µg

Gruppe	M1 von L6	M2 von L6	M1 von L5	M2 von L5
Ib 25µg	0,1808	0,2548	0,1964	0,2922
Ib 25µg	0,1872	0,2461	0,1750	0,2709
Ib 25µg	0,1582	0,2641	0,1775	0,2423
Ib 25µg	0,1756	0,3074	0,2419	0,2935
Ib 25µg	0,1567	0,2275	0,1871	0,2593
Ib 25µg	0,1637	0,2699	0,1810	0,2620
Ib 25µg	0,1624	0,2845	0,1765	0,2621
Ib 25µg	0,1809	0,2677	0,1908	0,2719
Ib 25µg	0,1869	0,2465	0,1607	0,2466
Ib 25µg	0,1765	0,2437	0,1995	0,2413
Ib 25µg	0,1752	0,2666	0,1817	0,2548
Ib 25µg	0,1648	0,2241	0,1887	0,2780
Ib 25µg	0,1864	0,2688	0,2048	0,2500
Ib 25µg	0,1806	0,2761	0,1865	0,2669
Ib 25µg	0,1717		0,1767	
Ib 25µg	0,1795	0,2599	0,1960	0,2375
Ib 25µg	0,1811	0,2977	0,1975	0,2518
Ib 25µg	0,1608	0,2565	0,1940	0,2641
Ib 25µg	0,1701	0,2916	0,1946	0,2365
Ib 25µg	0,1646	0,2526	0,1931	0,2655
Ib 25µg	0,1633	0,2377	0,1844	0,2365
<b>MW:</b>	<b>0,1727</b>	<b>0,2622</b>	<b>0,1897</b>	<b>0,2592</b>
<b>SD:</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,0235</b>	<b>0,0157</b>	<b>0,0137</b>

Tab. 11: DXA-Ergebnisse aller Tiere aus der 4. experimentellen Gruppe gemessen an Lendenwirbelkörper (L) 5 und 6 bei der Messung (M) vor Therapiebeginn (1) und nach Therapieende (2) in mg/cm<sup>2</sup>

## Anhang

### 9.1.3. Unterschiede bezüglich der Knochenmenge in der Peripherie

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>
	14,79	7,57	16,53	23,90
	17,88	3,71	32,26	47,23
	24,10	3,73	40,85	30,15
	9,81	7,60	16,92	35,68
	32,98	6,85	38,00	32,11
	17,01	6,51	25,72	39,83
	21,52	6,38	21,60	28,73
	11,44	7,35	24,96	24,99
	13,65	7,62	23,99	30,59
	18,13	5,58	28,39	28,41
	26,23	6,01	26,08	21,34
	12,20	6,85	32,46	39,80
	7,47	7,83	10,23	35,01
	7,34	5,29	40,64	33,38
	6,43	3,96	22,33	35,14
		6,86		30,36
		13,83		36,72
		6,91		37,07
		15,10		
		6,62		
		12,09		
<b>MW:</b>	<b>16,80</b>	<b>7,40</b>	<b>26,70</b>	<b>32,80</b>
<b>SD:</b>	<b>7,60</b>	<b>3,00</b>	<b>8,90</b>	<b>6,40</b>

Tab. 12: Histologische Ergebnisse der einzelnen Tiere aus den vier experimentellen Gruppen in Prozent

## Anhang

### 9.1.4. Unterschiede bezüglich der Osteointegration

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>
	92,69	37,91	22,36	94,51
	60,19	52,71	44,46	100,00
	49,80	9,84	27,92	17,37
	40,91	12,79	86,85	99,98
	58,49	80,57	37,46	83,26
	48,19	41,69	59,88	89,84
	67,96	24,49	25,66	54,14
	36,51	24,61	94,39	31,12
	51,39	26,59	66,81	31,11
	5,57	13,46	40,46	49,62
	95,47	3,91	72,76	28,05
	96,81	18,90	61,76	95,83
	5,15	31,13	69,64	97,60
	54,93	8,27	16,08	34,31
	13,91	3,22	32,67	76,42
		13,37		73,11
		23,24		55,85
		11,88		95,87
		6,22		
		36,60		
		16,02		
<b>MW:</b>	<b>54,50</b>	<b>23,70</b>	<b>50,60</b>	<b>67,60</b>
<b>SD:</b>	<b>25,50</b>	<b>18,60</b>	<b>24,40</b>	<b>26,80</b>

Tab. 13: Histologische Ergebnisse der einzelnen Tiere aus den vier experimentellen Gruppen in Prozent

## Anhang

### 9.2. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
a.-p.	anterior-posterior
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Atmosphärisches Plasmaspritzen
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	„area under the curve“, Gebiet unter der Kurve
B	Breite
BMC	„Bone Mineral Content“, Knochenmineralgehalt
BMD	„Bone Mineral Density“, Knochenmineraldichte
BMU	“basic multicellular unit”
BO	Bonit <sup>®</sup>
BRU	bone remodeling unit
bspw.	beispielsweise
BV	Bone Volume, Knochenmasse
BWS	Brustwirbelsäule
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C	Vertebrae Caudales, Schwanzwirbelkörper
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Calcium
CaP	Calciumphosphat
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
Co	Kobalt
Cr	Chrom

## Anhang

DXA	Dual X-ray Absorptiometry, Zwei-Energien-Röntgen-Absorptiometrie
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
evtl.	eventuell
exp.	experimentell
FAE	Free acid equivalence, Freie Säurenäquivalenz
FDA	Food & Drug Administration
Fe	Eisen
g	Gramm
Gr.	Gruppe
GM-KBE	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildende Einheit
Gy	Gray
h	hour, Stunde
H	Höhe
H	Wasserstoff
HA	Hydroxylapatit
Hz	Hertz
Ib	Ibandronat
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K	Kalium
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KV	Kilovolt
KW	Kilowatt

## Anhang

l	Liter
L	Länge
L	Lendenwirbelkörper
LWK	Lendenwirbelkörper
LWS	Lendenwirbelsäule
M	Messung
mAs	Milliamperesekunde
M-CSF	“Macrophage Colony Stimulating Factor”
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
mmol	Millimol
ms	Meter/Sekunde
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
O	Sauerstoff
OVX	Ovariectomy, Ovarrektomie
p	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanz
P	Phosphor
pixel	picture element
PMMA	Polymethylmethacrylat
pQCT	peripheral Quantitative Computed Tomography, periphere Quantitative Computertomographie

## Anhang

PTH	Parathormon
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
QCT	Quantitative Computed Tomography, Quantitative Computertomographie
r	Korrelationskoeffizient
R	Region
R'	Rest
rhTGF-beta1	recombinant human transforming growth factor-beta1
s.c.	subcutan
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
sec	Sekunde
SHAM	Scheinovarektomie
SXA	Single X-ray Absorptiometry, Ein-Energie-Röntgen-Absorptiometrie
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TV	Tissue Volume, Gewebemasse
UHMWPE	Ultra High Molecular Weight Polyethylen
V	Volt
VPS	Vakuum Plasmaspritzen
vs.	versus
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZFE	zentrale Forschungseinrichtung

## Anhang

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{Sv}$	Mikro Sievert



## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Andreas Kurth für die Überlassung dieser interessanten Arbeit bedanken. Für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung bin ich ihm sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Eberhardt bedanken, da er mir des öfteren sowohl bei Problemen rund um die Doktorarbeit als auch in medizinischen Belangen behilflich war.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, der diese externe Arbeit als Mitglied der Tiermedizinischen Fakultät betreut und eingereicht hat und mir somit ermöglicht hat, den Titel Dr. med. vet. zu führen. In diesem Zusammenhang muss auch meine Kommilitonin Sibylle Gröters genannt werden, die mir „ihren“ Doktorvater empfohlen hat, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Der praktische Teil meiner Arbeit führte mich glücklicherweise nach Mannheim, wo ich Herrn Dr. Frieder Bauss und seine Mitarbeiter Herrn Stefan Hoert, Herrn Dr. Frank Herting und Herrn Gunther Muth kennen lernte. Für die schöne gemeinsame Zeit und die ständige, freundliche Unterstützung (selbst noch Monate und Jahre später) möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Eine wirklich große Hilfe bei der Ausmerzung all der Tücken, die ein Computer mit sich bringen kann (und das waren einige) war mir Herr Prof. Dr. Jankowski, dafür vielen Dank.

Mein Dank gilt natürlich auch allen Freunden, Verwandten und Bekannten, die mich im Verlauf dieser Arbeit mit all ihren Höhen und Tiefen hindurch begleitet, bewundert, bemitleidet, aufgemuntert, angetrieben und unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner besten Freundin Petra Götz, meinen Eltern und Nando bedanken. – Vielen Dank für alles!!!

