

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

Simultaner Nachweis von Phosphatasen und Bisphosphonaten im humanen Knochengewebe

Alexander Mehlhorn

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. B. Pontz

Die Dissertation wurde am 23.06.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

4-NPP	4-Nitrophenylphosphat
BMD	Bone Mass Density
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
CA II	Carboanhydrase II
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
eNOS	endotheliale Nitricoxidsynthetase
Gp130	Glycoprotein 130
hFOB	Human Fetal Osteoblast - Zelllinien
HPLC	High Perfomance Liquid Chromatographie
IL-1	Interleukin 1
Il-11	Interleukin 11
LIF	Leucaemia inhibitor factor
M-CSF	Colony stimulaiting factor
MITF	Mikrophthalmie Transkriptionsfaktor
OSM	Onkostatine M
PTH	Parathormon
PU.1	ETS-Transkriptionsfaktor, Bindung an TRAP-Promotersequenz
PiP	PU.1-interacting Protein
RANK	Rezeptor-Antigen of NF κ b
RANKL	Rezeptor-Antigen of NF κ b- Ligand
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatographie
TEP	Totalendoprothese
TGF- β	Tissue growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAP	Tartratresistente, saure Phosphatase (=TRACP)
VNR	Vitronektinrezeptor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.1.	Geschichte der Bisphosphonate	5
1.2.	Chemische Struktur der Bisphosphonate	5
1.3.	Einlagerung von Bisphosphonaten in den Knochen	7
1.4.	Wirkungsmechanismen der Bisphosphonate	8
1.5.	Bedeutung von Bisphosphonaten für den Knochenstoffwechsel	12
1.6.	Indikation der Bisphosphonate	13
1.7.	Die TRAP als Parameter des Knochenabbaus	15
1.8.	Methoden der analytischen Chemie zum direkter Nachweis von Bisphosphonaten	16
2.	Material und Methode	18
2.1.	Material	18
2.1.1.	Gewinnung der Knochenproben	18
2.1.2.	Patientenbefragung	18
2.1.3.	Verwendete Substanzen	19
2.2.	Bestimmung von Bisphosphonaten im humanen Knochengewebe	26
2.2.1.	Bearbeitung der Knochenzylinder und Knochenpäne	26
2.2.2.	Aufbereitung des Knochens für die Chromatographie	33
2.2.3.	Nachweis von Bisphosphonaten mittels komplexometrischer Methode	34
2.2.4.	Schneiden von Knochenblöcken mit dem Cryostat	35
2.2.5.	Schneiden von Kartoffelstücken mit dem Cryostat	36
2.2.6.	Nachweis Aktivität der sauren Phosphatase im Cryostat-Knochendünnschnitt	36
2.2.7.	Einbettung von Knochengewebe in Methyl-Methacrylat	39
2.2.8.	Einbettung von Knochengewebe in Glycol-Methacrylat	42
2.2.9.	Scheiden der MMA- Blöcke mit dem Polycut E	43
2.2.10.	Histochemisches Anfärben der TRAP mittels Burstone`s Media	43
2.2.11.	Direkte Azokupplung mit Naphtol-AS-BI-Phosphate und Pararosanilin	44
2.2.12.	Pentachromfärbung nach Movat	45
2.2.13.	Bearbeitung der Schnitte nach dem Färbeprozess	46
2.2.14.	Photometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität mittels p-Nitrophenylphosphat	47
2.2.15.	Photometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität im Knochen mittels ELISA	49
3.	Ergebnisteil	52
3.1.	Direkter Nachweis von Clodronat mittels Thorium-Xylenolorange	52
3.2.	Direkter Nachweis von Alendronat in humanem Knochen mittels HPLC	53
3.3.	Histochemischer Nachweis der TRAP in Gefrierschnitten	54
3.4.	Histochemischer Nachweis der TRAP in GMA-Schnitten	55
3.5.	Histochemischer Nachweis der TRAP und Pentachromfärbung in MMA- Schnitten	55

3.5.1.	Die TRAP-positiven Lakunen im Knochendünnschnitt	55
3.5.2.	Dünnschnitt von Kontrollgewebe	58
3.5.3.	Histologischer Nachweis der Knochenvitalität mittels der Pentachrom-Färbung	59
3.5.4.	Ermittlung der durchschnittlichen Anzahl TRAP- positiver Lakunen	60
3.6.	Nachweis der TRAP in Knochenspänen mittels chemischem 4-NPP-Assay	63
3.6.1.	Auswertung der Daten von n=6 Patienten	63
3.6.2.	Abhängigkeit der TRAP- Aktivität von der Knochenspangröße	64
3.7.	Nachweis der TRAP in Knochenspänen mittels ELISA-Verfahren	66
3.8.	Auswertung der Fragebögen	69
4.	Diskussion	71
4.1.	Wertung der experimentellen Methoden	71
4.2.	Bisphosphonate und Bedeutung der erhobenen Befunde für die Klinik	76
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	84
7.	Anhang (Verarbeitung und Auswertung der Patientenproben)	auf CD-ROM
8.	Danksagung	91

1. Einleitung

1.1. Geschichte der Bisphosphonate

Erstmals wurden Vorläufer der heutigen Bisphosphonate im 19. Jahrhundert hergestellt, um mit diesen Substanzen als Komplexbildner von Kalziumionen die Bildung von Kesselstein in Rohrleitungen und die Verkalkung der Waschmaschinen zu verhindern. Die Arbeitsgruppe von Prof. Fleisch konnte 1960 erstmals zeigen, dass die chemische Ursubstanz der Bisphosphonate, das Pyrophosphat, die Bildung von Hydroxylapatit hemmt und schrieb diesem eine Regulatorfunktion der physiologischen Verkalkung zu. So wurde darüber 1961 im American Journal of Physiology erstmals publiziert, 1966 und 1969 folgten weitere Veröffentlichungen in renommierten Zeitschriften wie Science und Nature Magazine. Zwanzig Jahre später wurden dann erstmals Bisphosphonate für den klinisch-experimentellen Einsatz am Menschen synthetisiert und erstrecken sich heute auf ein sehr breitgefächertes Einsatzgebiet.

1.2. Chemische Struktur der Bisphosphonate

Bisphosphonate haben eine große Affinität zum Knochen, die bedingt ist durch ihre chemische Struktur; chemisch stammen diese Verbindungen vom Pyrophosphat ab, welches durch seine P-C-P- Bindung und zwei Restgruppen gekennzeichnet ist. Die Phosphatgruppen wirken als Chelatbildner und binden so an ein Ca^{2+} -Ion des Knochens. Alle Bisphosphonate sind nach diesem Schema aufgebaut, Unterschiede ergeben sich durch Länge und chemische Struktur der beiden Gruppen R_1 und R_2 des Kohlenstoffatoms (Abb. 1.). Diese Gruppen bestimmen den Wirkmechanismus des jeweiligen Bisphosphonats.

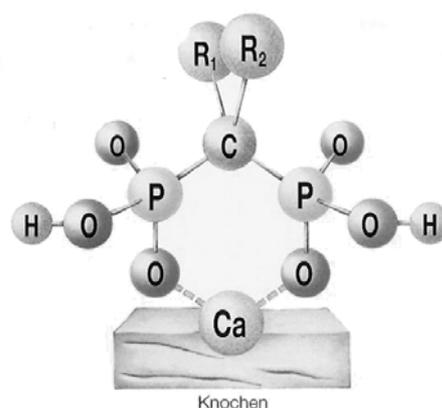
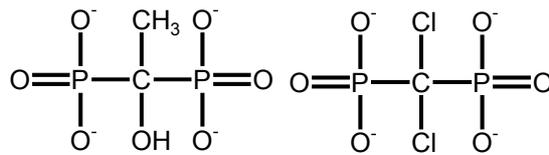


Abbildung 1: Grundstruktur des Bisphosphonats mit den zwei Restgruppen der P-C-P-Bindung, R_1 und R_2 , hier gebunden an ein Ca^{2+} -Atom des Knochens.

Bei Betrachtung dieser Strukturformeln lassen sich, je nach Restgruppen, Ähnlichkeiten zu Molekülen des Mevalonatstoffwechsels, wie Farnesyldiphosphat oder zu energiereichen Triphosphaten, wie Adenosintri-phosphat vermuten. Zu erster Gruppe zählen Alendronat, Pamidronat, Risedronat, und Ibandronat mit ihrem primären Amin in der Restgruppe, zur zweiten Gruppe rechnet man Clodronat und Etidronat [75].

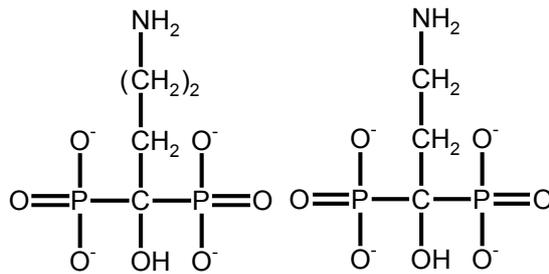
Bisphosphonate ohne Stickstoffsubstitution



Etidronat

Clodronat

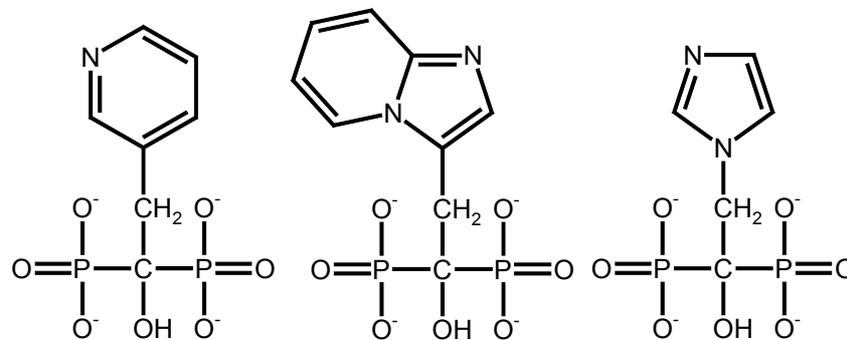
Aminobisphosphonate



Alendronat

Pamidronat

Bisphosphonate mit basischen Heterocyclen

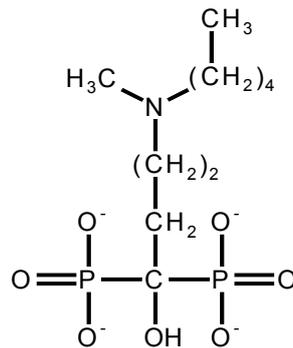


Risedronat

YM 529

Zoledronat

Am Stickstoffsubstituierte Bisphosphonate



Ibandronat

Abbildung 2: Strukturformel der Bisphosphonate Clodronat, Etidronat, Alendronat, Pamidronat, Risedronat, YM529, Zoledronat und Ibandronat

1.3. Einlagerung von Bisphosphonaten in den Knochen

Der bevorzugte Ort der Einlagerung sowie die Freisetzung der Bisphosphonate aus dem Knochen sind durch die chemische Struktur bestimmt. Dies wurde in entsprechenden Studien geprüft. Hunde erhielten über 1 Jahr täglich 0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25mg/kg Pamidronat per os (vgl. Gesamtdosis beim Menschen etwa 10mg-90mg/d). Eine Gruppe wurde nach einem Jahr geopfert, die andere, welche noch ein Jahr unter Bisphosphonatpause weiter lebte, nach zwei Jahren. Hierbei zeigte sich mittels analytischer Methoden, dass sich in Knochen mit hohem trabekulärem Anteil, wie den Wirbelknochen, mehr Bisphosphonat anreichert als in Knochen mit hohem kortikalem Anteil, wie dem Os ilium. Dies ist auf die größere Knochenumbaurate des trabekulären Knochens zurückzuführen. Innerhalb des einen Jahres ohne Pamidronat kam es in den Knochen zu einem Abfall der Bisphosphonatkonzentration von bis zu 45%, wobei auch hier die größte Abnahme in Knochen mit hohem Knochenumsatz bzw. hohem trabekulärem Anteil nachzuweisen ist. Unterschiede bestehen hierbei auch in der Dosierung der Bisphosphonate, denn bei Hunden, die 25mg/kg erhielten, bleibt das Pamidronat prozentual länger im Knochen eingelagert als in der 12,5mg/kg-Gruppe. Das Bisphosphonat scheint wohl in der hohen Dosis den Knochenstoffwechsel stärker zu bremsen. Es besteht ein nur annähernd linearer Zusammenhang zwischen Dosierung und Einlagerung. Die Autoren King und Mitarbeiter folgern aus den Daten einen biochemisch nicht sättigbaren Prozess der Einlagerung [45].

Sato et al. hingegen versuchten Aussagen anhand eines Rattenmodells mit einmaliger Gabe von 0,4mg/kg radioaktiv markiertem [³H]- Alendronat zu treffen. Es zeigte sich, dass sich das

Alendronat besonders in der Nähe der Osteoklasten, nämlich in deren Resorptionslakunen, nachweisen lässt. Diese Beobachtung wurde anhand eines „in vitro“- Versuches weiter abgeklärt: Knochen gibt in einem sauren Milieu von pH 3,5, das dem Milieu einer Resorptionslakune entspricht, 50% des gebundenen Alendronats ab. Mit einem Szintillationszähler lies sich eine Aufnahme von 49,7 % +/- 12,2% des einmalig injizierten Alendronats nachweisen. Auf Grund ihrer Beobachtungen folgern Sato et al., dass es sich bei der Aufnahme des Bisphosphonats um einen sättigbaren Prozess mit einer geschätzten Bindungskapazität von 105 nmol radioaktivmarkiertem [³H]- Alendronat auf 1 mg Knochen (pH 7,2) handelt. Für den Menschen bedeutet dies eine maximale Gesamtaufnahme von 90g Alendronat, welche im gesamten Skelettsystem eingelagert werden [78].

1.4. Wirkungsmechanismus der Bisphosphonate

Aufgrund der chemischen Struktur und ihres damit verbundenen Wirkungsmechanismus können die Bisphosphonate in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Die Gruppe I ist chemisch dem Pyrophosphat bzw. den energiereichen Triphosphaten und die Gruppe II den langkettigen Farnesyldiphosphaten ähnlich. Vertreter der Gruppe I hemmen den Stoffwechsel einer Zelle durch Hemmung ATP-abhängiger Enzyme. Vertreter der Gruppe II wirken dagegen komplexer, sie greifen in den Mevalonatstoffwechsel ein und imitieren hier das Isopentenylpyrophosphat, das Geranylpyrophosphat, Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Dies hat zur Folge, dass dazugehörige Enzyme blockiert werden und die langkettigen Pyrophosphate nicht gebildet werden. Letztendlich wird somit die posttranslationale Modifikation mittels Farnesylierung, Geranylisierung und Geranylgeranylierung kleiner GTPasen wie rac, rho, cdc 42 und rab gehemmt. Die farnesylierten ras-Proteine sind für die Organisation der Zelle und für das sogenannte „Cellular Trafficking“ zuständig: die geranylierten Rho-, Rac- und cdc42-Proteine regulieren die Membrandifferenzierung und die Apoptose, die geranylgeranylierten Rab-Proteine steuern die Exo- und Endozytose und die Zellpolarität [74, 75]. Dies hat zur Folge, dass die Zelle in ihrer Signaltransduktion eingeschränkt ist, weniger „Überlebenszeichen“ geben kann und Apoptose begeht. Es zeigt sich in Osteoklasten unter Bisphosphonatexposition eine erhöhte Caspase-3-Aktivität, was auf einen bisphosphonatinduzierten Zelltod schließen lässt [3]. Zusätzlich werden monozytische Vorläuferzellen bei ihrer Fusion durch Bisphosphonate gehindert. Reife Osteoklasten bilden eine schwächere, apikale Zelldifferenzierung („Ruffled Borders“), sowie ein instabileres Aktinskelett bzw. Aktinringe aus, was elektronen-

mikroskopisch nachgewiesen werden kann (Abb. 3) [81]. Bisphosphonate hemmen also die Zelldifferenzierung und die Rekrutierung von Osteoklasten aus Stammzellen.

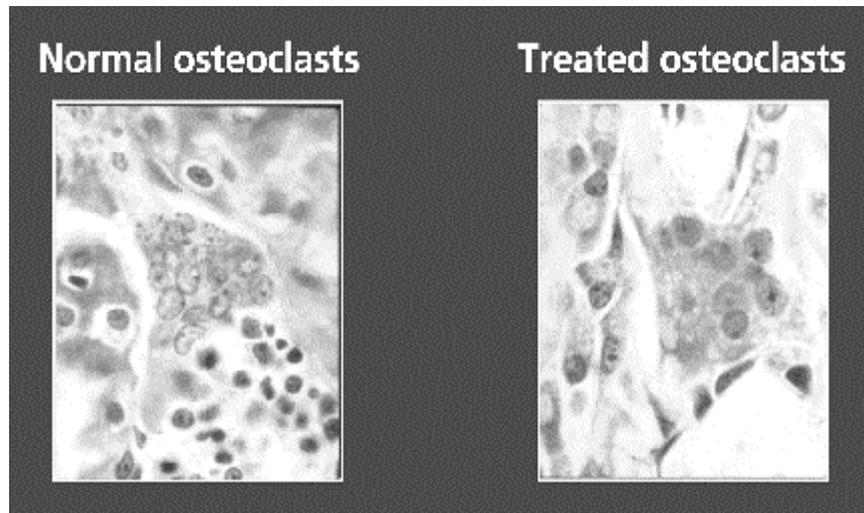


Abbildung 3: Zytoplasmatische Veränderungen eines Osteoklasten unter Einfluss von Etidronat [81]

Die Bisphosphonate haben eine hemmende Wirkung auf die „V-Type Protonen-ATPase“, mit der die Osteoklasten den Knochen ansäuern und auflösen. Hierbei sind besonders Tiludronat, aber auch Alendronat, Icandronat und Etidronat wirksam [15]. In Zellkulturen zeigt sich neben diesem Mechanismus auch noch eine hemmende Wirkung der Bisphosphonate auf verschiedene Protein- Tyrosin- Phosphatasen, die vermehrt in Osteoklasten gebildet werden und die Ausbildung des Zytoskeletts unterstützen [65].

Zusätzlich haben Bisphosphonate einen Einfluss auf die Bildung von Interleukinen (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-6), der allerdings konträr ist; denn hier besteht wohl eine partielle Hemmung der Freisetzung und somit ein antiinflammatorischer Effekt durch Bisphosphonate der Gruppe I (Clodronat, Etidronat). Diese Eigenschaften sind durch einige *in vitro*-Versuche [55, 62] und in der klinischen Anwendung bestätigt. Dagegen wird auch eine Erhöhung der IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ –Serumspiegel unter Therapie mit Aminobisphosphonaten als akute Phase-Reaktion beschrieben [52, 79]. Diese gegensätzliche Wirkung auf die Interleukinfreisetzung kann ein Regulator für die beobachtete und nachgewiesene Hemmung der Osteoklastenrekrutierung aus hämatopoetischen Stammzellen sein, die u.a. abhängig von IL-1, IL-2, IL-6, IL-11 und $\text{TNF}\alpha$ ausdifferenzieren [47]. Diese Vorläuferzellen der Osteoklasten stammen aus dem hämatopoetischen System und entwickeln sich in Zellkulturen in Anwesenheit von Stromazellen oder Osteoblasten und Vitamin D zu reifen Osteoklasten [93]. Nach neuesten Erkenntnissen findet ein Zell-zu-Zell-Kontakt von Stromazellen und Vorläuferzellen zwischen den, an der Zelloberfläche membrangebundenen, zytokinähnlichen Proteinen aus

der TNF-Rezeptor-Superfamilie statt: dem Rezeptor Aktivator of NF- κ b (RANK) der Osteoklastenvorläuferzellen und dem RANK- Ligand (RANKL) der Stromazellen, Osteoblasten oder T-Lymphozyten [94].

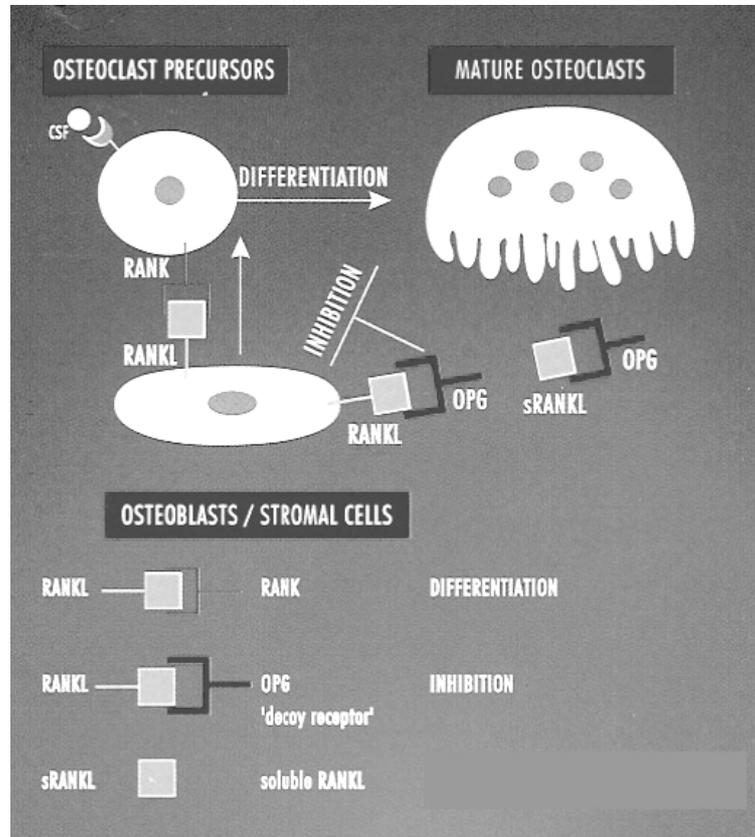


Abbildung 4: Zell-Zell Interaktionen der Osteoklastenvorläufer und Stromazellen

Der Zell-zu-Zell-Kontakt wird vor allem durch M-CSF und IL-1 stimuliert und lässt die Osteoklasten reifen und sich zu mehrkernigen Formationen zusammenschließen [35]. Die Expression von RANK und RANKL wird insgesamt durch viele Faktoren moduliert, so induziert BMP-2 den osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktor Cbfa 1, der wiederum die Expression von RANKL stimuliert. Ebenso beeinflussen Glucokortikoide und PTH die RANKL- Expression. Als drittes Protein der TNF- Rezeptor-Superfamilie ist seit kurzem das Osteoprotegerin bekannt, welches auch an RANKL bindet, mit RANK um dem Bindungsplatz konkurriert und so die Osteoklastogenese hemmt. Auch die Expression von Osteoprotegerin wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, so stimulieren Vitamin D, IL-1, TNF, BMP 2, Östrogene und TGF- β die Expression von Osteoprotegerin, Glucokortikoide hemmen sie [36]. Diesem Protein wird in seiner Rolle beim tumorinduzierten Knochenschmerz [91], in der Pathogenese der Osteoporose oder Osteopetrose viel Bedeutung zugeschrieben. Neueren Studien zufolge sollen die Bisphosphonate Zoledronat und Pamidronat die Expression des

Osteoprotegrins von primären menschlichen Osteoblasten nach einer Kulturzeit von 72 Stunden auf das zwei- bis dreifache steigern [98]. Dagegen konnten Kim und Mitarbeiter zeigen, dass die Inkubation von Mäuseosteoblasten mit Alendronat oder Pamidronat für maximal 48 Stunden keine Einfluss auf die OPG- Expression hat [43].

Der Zell-zu-Zell-Kontakt wird durch Il-1, IL- 11, Il- 6, Oncostatin M (OSM), Leukemia Inhibitory Faktor (LIF), Prostaglandin E2 (PG-E2) und PTH über zwei verschiedene Signaltransduktionswege verstärkt. So binden PG-E2 und PTH an die entsprechenden Rezeptoren und erhöhen die zelluläre cAMP- Konzentration, während Il-1 diese indirekt über Erhöhung der PG- E2- Konzentration ansteigen lässt [1]. IL- 11, OSM, LIF und Il- 6 mit sIL- 6R dagegen vermitteln ihr Zellsignal über einen Rezeptor, der das signalübermittelnde gp 130 gebunden hat [89].

Neben diesem Differenzierungsweg existiert noch eine zweite Möglichkeit des Organismus, vermehrt Osteoklasten aus Vorläuferzellen zu rekrutieren. Man nennt diesen Weg "RANK-Ligand-unabhängig". Kobayashi et al. konnten zeigen, dass sich Knochenmarkszellen in Anwesenheit von TNF- α und M-CSF zu reifen Osteoklasten ausdifferenzieren [47]. Dieser Prozess findet in entzündungsinduzierter Osteoklastogenese statt und kann bei partikelinduzierten Lockerungsprozessen von Endoprothesen beobachtet werden [83].

Um schließlich nach diesen beiden Reifungsprozessen den funktionsfähigen, reifen Osteoklasten nachzuweisen, werden als Marker der Calcitonin- Rezeptor, Carboanhydrase II, a und b- Untereinheiten der Vitronectin- Rezeptoren, Metalloproteinase 9, Protein Tyrosin Proteinase, OC-2, avb3- Integrin, p60^{c-src} und die tartratresistente, saure Phosphatase 5b bestimmt [5]. Alatalo et al. untersuchten z.B. den Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad der Osteoklasten und Konzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase 5b, die mittels immunologischer Methoden nachgewiesen wurde. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Parameter eng miteinander verknüpft sind und diese Methode zur Bestimmung des Differenzierungsgrads der Osteoklasten geeignet ist [2].

Neben diesem Einfluss auf die Osteoklastenrekrutierung aus Stammzellen haben Bisphosphonate in Zellkultur auch eine Wirkung auf Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. So stimulieren Pamidronat, Etidronat und Zoledronat dosisabhängig in Human Fetal Osteoblast -Zelllinien (hFOB) die Bildung der alkalischen Phosphatase, von Kollagen Typ I und die Mineralisation der extrazellulären Matrix, weiter die Formation und die Ausdifferenzierung der Osteoblasten, wobei allerdings die relative Zellzahl im Vergleich zur Kontrollkultur abnimmt [72]. Diese Abnahme der Zellzahl beobachtet man auch in anderen

Zellkulturen, aus Osteoklasten [37], Makrophagen [73], Mammakarzinomzellen [84] und Prostatakarzinomzellen [50]. Im Gegensatz dazu wird allerdings eine protektive Wirkung auf Knochenmarksvorläuferzellen [46], Osteoblasten und Osteozyten [68] beschrieben.

1. 5. Bedeutung von Bisphosphonaten für den Knochenstoffwechsel

Auf Grund ihrer Wirkung auf den Osteoklasten haben die Bisphosphonate eine anti-katabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel, es wird weniger Knochen abgebaut. Dagegen soll eine stimulierende Wirkung der Bisphosphonate auf die Osteoblasten zu einer anabolen Wirkung auf den Knochen führen [72].

Dieser Einfluss auf den Knochenstoffwechsel kann am besten mit den Markern des Knochenauf- und abbaus erkannt und überprüft werden. Für einen gesteigerten Knochenaufbau der Osteoblasten sprechen erhöhte Werte der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase, der carboxyterminalen und aminoterminalen Peptide des Prokollagens Typ I, ein Produkt proliferierender Fibro- und Osteoblasten und des Osteocalcins, ein Regulator der Mineralisation der Knochenmatrix [5].

Auf der anderen Seite sind bei gesteigertem Knochenmatrixabbau erhöhte Werte des Hydroxyprolins, des Pyridinolins, des Deoxypyridinolins, des aminoterminalen und carboxyterminalen „crosslinked telopeptids“ des Kollagen Typ I und des Hydroxylysinglycosids nachweisbar. Der einzige Marker einer katabolen Stoffwechsellage des Knochens, der von Osteoklasten direkt gebildet wird, ist die tartratresistente, saure Phosphatase 5 (TRAP 5). Sie katalysiert und reguliert den Knochenabbau [5].

Um die Wirkung einer Bisphosphonattherapie auf den Knochenstoffwechsel zu belegen, wurden entsprechende klinische Studien durchgeführt und diese Marker gemessen. Martinez und Kollegen untersuchten 14 Patienten, erkrankt an M. Paget, die fünf Tage je 15 mg Pamidronat intravenös erhielten. Am 8., 15. und 30. Tag nach der Einnahme wurde der Urin der Patienten auf freie Pyridinoline, Hydroxyprolin, sowie auf TRAP und das Blut auf alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Calcium untersucht. Unter Pamidronattherapie fielen diese Marker des Knochenabbaus ab: Dies betraf insbesondere die Pyridinoline, das Hydroxyprolin und den Calciumspiegel. Etwas moderater sank die Urinkonzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase (TRAP), von 6,1 IU/l am Tag 8 auf 4,2 IU/l am Tag 30. Die Konzentration des Osteocalcin hingegen stieg im Laufe der Messungen an [56].

Pedrazzoni und Mitarbeiter behandelten 23 Patienten, erkrankt an M. Paget oder Osteoporose, zwei Tage lang mit je 5 mg intravenösem Alendronat oder zwei Tage mit je 600 mg

Clodronat. In Folge wurde dann der Urin über 28 Tage auf aminoternale und carboxyterminale quervernetzte Telo peptide des Kollagen Typ I, Hydroxyprolin, freie Pyridinoline und auf die tartratresistente, saure Phosphatase 5 (TRAP 5) untersucht. Diese Daten zeigen, dass nach Absetzen der Bisphosphonate alle Marker nach 7 bis 14 Tagen abfielen. Der sensibelste Marker des Knochenabbaus ist hier das „crosslinked N-Telo peptid“ des Kollagen Typ I, welches um 55% in der Osteoporosegruppe und um 65% in der M. Pagetgruppe sank. Die Konzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase (TRAP) nahm auch hier moderater, aber signifikant um 16% in der Osteoporosegruppe und um 21% in der Pagetgruppe ab, wobei die niedrigsten Werte am 14. Tag beobachtet wurden und dann bis zum 28 Tag wieder anstiegen [67].

In beiden Studien zeigt sich unter Gabe von Bisphosphonat über einen kurzen Zeitraum ein starker Abfall der Pyridinoline und der „Crosslinked-Telo peptide“ und eine geringere, aber signifikante Abnahme der TRAP-Konzentration um etwa 20%. Die Wirkung der Bisphosphonate nach ihrem Absetzen scheint nach etwa 14-28 Tagen nachzulassen.

Als besonders interessante, klinische Anwendung sei noch die Möglichkeit angesprochen, dass die frühzeitige Lockerung einer Hüftendoprothese durch ein Screening der Marker des Knochenabbaus frühzeitig erkannt werden kann; denn hierbei kommt es früher als radiologisch nachweisbar durch die periprothetische Osteolyse zu einem Anstieg des „crosslinked N-Telo peptids“ [82].

1.6. Indikationen der Bisphosphonate

Die Bisphosphonate werden derzeit vornehmlich bei erhöhten Knochenabbau und der hierdurch hervorgerufenen Hyperkalzämie eingesetzt. Dies ist zum einen beim Morbus Paget der Fall, bei dem eine gesteigerte Osteoklastenaktivität, ein reaktiv überschießender Anbau von Geflechtknochen beobachtet wird und sich die Symptomatik unter Bisphosphonattherapie verbessert [17]. Ein großes Einsatzgebiet ist die Osteoporose und ihre unterschiedlichen Erscheinungsformen. Bei einem Übergewicht des katabolen Knochenstoffwechsels kommt es zur Abnahme der Knochentrabekel und der gesamten Knochenmasse. Bisphosphonate bremsen den katabolen Stoffwechsel, wie zahlreiche Studien der „evidence based medicine“ belegen. So belegt die FOSIT- Studie [18], dass das Frakturrisiko bei postmenopausalen Frauen mit Bisphosphonaten signifikant gesenkt, sowie die Knochendichte erhöht werden kann [23, 51]. Auch im „Fraktur Intervention Trial (FIT)“ zeigte sich in einem Kollektiv von 3658 Frauen mit klinisch manifester Osteoporose oder stattgefundenen Wirbelkörperfraktur

bei geringer Knochendichte, dass das Frakturrisiko an Schenkelhals und Wirbelsäule mit Gabe von Alendronat über drei bis vier Jahre signifikant gesenkt werden konnte [6].

Schwerpunkt neuester Forschung ist zurzeit der Einsatz von Bisphosphonaten zur Therapie der tumorinduzierten Hyperkalzämie bei metastasiertem Mamakarzinom [70], multiplem Myelom [42, 59] und dem metastasiertem Prostatakarzinom [13, 88]. Es wird eine hemmende Wirkung von Bisphosphonaten auf die Metastasierungstendenz der obengenannten Tumoren vermutet [104], in der Zellkultur kann ein zytotoxischer Effekt auf diese Tumorzellen nachgewiesen werden [84, 90]. So zeigt sich in einer neu veröffentlichten „Multicenterstudie“ von Powles, dass es in einem Kollektiv von 1069 Patientinnen mit operablem Mammakarzinom unter Gabe von 1600mg Clodronsäure pro Tag (über 2 Jahre) zu einer signifikanten Abnahme der Metastasierungstendenz kommt [69]. Damit eng verknüpft sind sicherlich auch Ergebnisse aus Tier- und Zellkulturversuchen: Es wird ein hemmender Einfluss der Bisphosphonate auf die Neubildung von Gefäßen in Tumoren [77] und sogar auf die Zellinvasion der Tumorzellen in neuen Geweben beobachtet [8].

Durch Bindung von Kalziumionen verhindern Bisphosphonate das Ausfällen von Kalziumphosphatkristallen. Diesen Schutz vor Verkalkung macht man sich in der Klinik zu Nutze, man kann Bisphosphonate bei manifesten ektopen Kalzifikationen einsetzen. Als Anwendungsgebiet werden folgende Erkrankungen genannt: Myositis ossificans, Sklerodermie, Fibrodysplasia ossificans progressiva [11], heterotope Ossifikation nach Hüftgelenkersatz durch Totalendoprothese [105]. Weiter wird versucht durch Beschichtung kardialer Stents deren Verkalkung zu verhindern [41].

Wegen ihrer antiinflammatorischer Wirkung werden die Bisphosphonate zur Behandlung des M. Sudeck erfolgreich eingesetzt [48]. In der Endoprothetik werden derzeit Experimente durchgeführt, um die durch Abriebpartikel ausgelösten Mechanismen der aseptischen Lockerung von Hüftendoprothesen zu vermeiden [85]. In neueren Studien wird sogar die Auswirkung von Bisphosphonaten auf den periprothetischen Knochenverlust nach totaler Hüftendoprothese untersucht. So zeigten Wilkinson und Kollegen in einer 26wöchigen Doppelblindstudie an 47 Männern, dass die einmalige Gabe von 90 mg Pamidronat direkt nach der Operation zu einem signifikant geringerem Verlust der periprothetischen „Bone Mass Density“ (BMD) und zu einem geringerem Ansteigen der Marker des Knochenabbaus führt [103]. Ebenso konnten Venesmaa und Hennings zeigen, dass eine längere postoperative Behandlung mit Alendronat verglichen mit der Kontrollgruppe über 24 Wochen bzw. 10 (5) Wochen zu einer signifikant höheren BMD des periprothetischen Knochens führt [33, 97].

Zuletzt können Diagnostika auf der Basis radioaktivmarkierter Derivate der Bisphosphonate genannt werden, die in der Nuklearmedizin im Rahmen der Knochenszintigraphie zum Einsatz kommen. Hier macht man sich deren sehr hohe Affinität zum Knochen zu Nutze.

1.7. Die tartratresistente, saure Phosphatase (TRAP) als Parameter des Knochenabbaus

Es handelt sich bei dem Isoenzym 5 der sauren Phosphatasen - die tartratresistente, saure Phosphatase (TRAP)- um einen Marker des Knochenabbaus. Dieses Enzym wird von Osteoklasten gebildet und ist so ein Parameter für deren Aktivität [61]. Es ist eine eisenhaltige Phosphorylase, die ihr spezifisches pH-Optimum bei 5,2 besitzt und gegenüber L (+)- Tartrat eine Resistenz besitzt. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf das mononukleäre, phagozytäre System und auf Erythrozyten [4]. Neueren Studien zufolge, lässt sich das Isoenzym 5, in eine Isoform 5a und 5 b auftrennen [49], wobei der Unterschied lediglich in einigen Sialinsäureresten der Isoform 5a besteht [24]. Die Isoform 5a wird laut unveröffentlichten Ergebnissen von J. Halleen von aktivierten Makrophagen gebildet (persönliche Mitteilung, CTS- Meeting 2003, Zagreb). Die Form 5b lässt sich nur in Osteoklasten und Makrophagen nachweisen. Da Makrophagen nur eine inaktive Form des Isoenzym 5b bilden, ist ein immunologischer Nachweis der aktiven TRAP 5b ein hochspezifischer Test der Osteoklastenaktivität [27]. Vergleicht man die Spezifität des Isoenzym 5b mit anderen Markern des Knochenabbaus in der Diagnose von verschiedenen Knochenerkrankungen, so zeigt sich, dass ein Anstieg der TRAP 5b bei Osteoporose und beim ossär metastasiertem Mamakarzinom diagnostisch wesentlich genauer ist; denn hierbei handelt es sich vermutlich um Abbauvorgänge durch Metalloproteinasen, bei denen die Telopeptide des Kollagens Typ I schwächer ansteigen. Dagegen steigen bei Erkrankungen, bei denen der Knochen vermehrt durch Cathepsin K abgebaut wird, alle Marker des Knochenabbaus spezifisch an [28].

Die Funktion der tartratresistenten, sauren Phosphatase ist noch nicht vollständig geklärt, eine regulatorische und katalytische Funktion in der osteoklastozytären Degradation des Knochens ist beschrieben. Osteoklasten sezernieren im Sinne eines Feedback-Mechanismus mit steigender Ca^{2+} -Konzentration, weniger tartratresistente, saure Phosphatase [63]. Zaidi et al. zeigen sogar, dass in Osteoklastenkulturen durch Inhibition der TRAP mittels Antikörper der Resorptionsprozess der Osteoklasten gestoppt wird [106]. Neueren Untersuchungen zu Folge ist das gebundene Eisen des Enzyms von großer Bedeutung. In seinem reduzierten Zustand kann es intrazellulär Sauerstoffradikale bilden, die wieder Knochenmatrix abbauen. Auch seine Funktion als Protein-Tyrosin-Phosphatase wird diskutiert [26].

Hayman und Kollegen konnten in Knock-out TRAP- (-/-) Mäusen zeigen, dass dieses Enzym für einen geregelten Knochenstoffwechsel notwendig ist; an diesen Mäusen wurde eine Störung der enchondralen Ossifikation und die Entwicklung einer leichten Osteopetrose beobachtet [31]. Betrachtet man die Expression des TRAP-Gens, so wurden zwei Transkriptionsfaktoren entdeckt, PU.1, aus der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren, welcher spezifisch an die TRAP-Promotersequenz bindet. Diese Bindungsstelle für PU.1 (GGAA) ist zehn Basenpaare von der Bindungsstelle des Mikrophthalmie Transkriptionsfaktor (MITF), dem zweiten Transkriptionsfaktor, lokalisiert [53]. Mäuse, denen das Gen für PU.1 fehlt, haben keine TRAP positiven mononukleären oder multinukleäre Osteoklasten, Mäuse, die kein MITF-Gen besitzen, exprimieren weniger Osteoklasten. Weiter zeigt sich, dass sich die beiden Transkriptionsfaktoren in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken [32, 92]. Matsumoto et al. entdeckten einen anderen synergistischen Transkriptionsfaktor zu MITF und PU.1, das PU.1-interacting Protein (PiP), welches auch die Transkription des TRAP-Gens verstärkt. Die Expression von PiP wiederum wird durch den RANK-Ligand der Stromazellen, Osteoblasten oder T-Lymphozyten verstärkt [58]. Die TRAP 5b ist beim M. Paget, beim Hyperparathyreoidismus mit Beteiligung des Knochens, und bei ossärer Beteiligung verschiedener maligner Tumoren erhöht. Ein verhältnismässig geringer Anstieg findet sich bei Patienten mit Osteoporose. Hierbei gibt es keine geschlechts-spezifischen Unterschiede der mittleren Serumwerte, die Enzymkonzentration scheint indirekt Proportional zur BMD eines Patienten zu sein [80].

Welche Auswirkungen nun eine Bisphosphonattherapie auf die tartratresistente, saure Phosphatase- Konzentration hat, wurde von Martinez und Pedrazzoni in einer klinischen Studie ohne Verwendung einer immunologischen Unterscheidung zwischen Isoform 5a und b untersucht und ist hier unter 1.4. beschrieben. Andere Isoenzyme findet man in Prostatagewebe (II und IV), in den zellulären Lysosomen, in der Plazenta und in der Kartoffel. Diese Gewebe können als Kontrollgewebe verwendet werden, um die Spezifität des L(+)-Tartrats zu prüfen [9].

1.8. Methoden der analytischen Chemie zum direkter Nachweis von Bisphosphonaten

Der Nachweis von Bisphosphonaten ist mit einfachen Methoden nicht durchzuführen. Aufgrund der polaren Eigenschaften ist eine Extraktion aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe in eine organische Phase erschwert. Weiter sind die Bisphosphonate nicht flüchtig, enthalten keine chromophoren Gruppen und sind von relativ einfacher chemischer Struktur. Wegen

dieser Eigenschaften ist deren Detektion nur mit hohem technischem Aufwand durchzuführen. Weiter muss man beachten, dass für jedes einzelne Bisphosphonat aufgrund der unterschiedlichen Seitenketten ein eigenes Nachweisverfahren benötigt wird. Eine Möglichkeit zum Nachweis ist die Fähigkeit zur Komplexbildung. Dies setzt voraus, dass die Bisphosphonate in isolierter Form vorliegen und nicht im Knochen eingebaut sind. So kann man die Bisphosphonate mit Cu^{2+} -, Fe^{3+} -, Al^{3+} -Ionen und Molybdän-Ascorbat komplexieren und die gebundenen Ionen nachweisen [14, 66]. Weiter bilden einige Bisphosphonate der ersten Generation, wie Clodronat und Etidronat, Komplexe mit den Farbstoffen Thorium-Morin und Thorium-Xylenolorange [99, 100]. Bei Komplexbildung mit Clodronat und Etidronat ändert sich deren Farbe und mit Titrations-Verfahren lassen sich dann deren Konzentrationen bestimmen.

Solche Titrations sind sehr ungenau und werden derzeit durch etablierte, gängige chromatographische Verfahren ersetzt. Die Proben bedürfen hierbei einer Vorbereitung, um Proteine zu denaturieren, sowie der Trennung von Kalziumionen und Bisphosphonaten. Bei diesen Verfahren wird mittels Ionenaustauscher Kalzium und Bisphosphonat getrennt. Bisphosphonate werden dann mittels HPLC oder RPLC analysiert, gefolgt von einer Derivatisierungsreaktion z.B. am primären Amin des Alendronats mit Naphtylisocyanat, 2,3-Naphtalenedicarboxyaldehyd oder o-Phthalaldehyd mit Mercaptoethanol. Das Eluat aus dem Chromatographen wird dann mittels Photodetektoren vermessen [86].

Es gibt hierzu umfangreiche Publikationen, die sich mit humanen Serumproben beschäftigen. In Tierknochen bestimmten Usui und Kollegen das Bisphosphonat YM 175 [95]. Vieth et al. entwickelten 1996 eine Methode, um Pamidronat in Hundeknochen mittels HPLC und der so genannten Precolumn-Derivatisierung mit 2,3-Naphtalene-dicarboxyaldehyd, einem Fluoreszenzfarbstoff, bis zu einer Nachweisgrenze von 7 ng pro mg Knochen nachzuweisen [44]. Neben diesen beiden Arbeiten bestehen keine weiteren Veröffentlichungen, die sich mit Knochengewebe beschäftigen.

Letztlich sei noch erwähnt, dass neben dieser Kombination aus Chromatographie und Derivatisierung, auch andere, zum Teil neuere Verfahren, wie die Kapillarelektrophorese und die Massenspektrometrie, zum Nachweis geeignet sind [30, 38].

2. Material und Methode

2.1. Material

Anmerkung:

Reagenzien, wenn nicht anders angegeben, werden von Merck Darmstadt bezogen.

2.1.1. Gewinnung der Knochenproben

Die Knochengewebe stammen aus humanen Hüftköpfen, die beim Einbau einer Totalhüftendoprothese (TEP) entnommen wurden. Dabei werden zwei Gruppen festgelegt:

Bisphosphonatgruppe A	Kontrollgruppe B
Patienten erhalten vor der TEP-Operation eine mehrwöchige Therapie mit Alendronat.	Patienten sind noch nie mit Bisphosphonaten therapiert worden und haben keinerlei primäre oder sekundäre Knochenerkrankungen

Tab.1: Randomisierte Einteilung der Patienten in zwei Gruppen

Einschlusskriterium

Die Schnitte werden in der von Movat beschriebenen Pentachromfärbung angefärbt (2.2.12.). Das Knorpelgewebe wird grün, der reife Knochen gelb, die Osteozyten blau und das neu gebildete Osteoid rot angefärbt. Als Einschlusskriterium für alle Hüftköpfe musste in allen Proben in Zone 1 und Zone 2 Bildung von Osteoid, als Zeichen einer anabolen Stoffwechsellage, nachweisbar sein.

2.1.2. Patientenbefragung

Um sich bei den Patienten der Bisphosphonatgruppe über die Regelmäßigkeit und Korrektheit der Medikamenteneinnahme, über Beschwerden bei der Einnahme und über die Einnahme anderer Medikamente, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen, zu erkundigen, wurde folgender Fragebogen entworfen:

siehe Anhang

2.1.3. Verwendete Substanzen und Geräte

2.1.3.1. Entnahme der Knochenzylinder und Knochenspäne

- Bandsäge (Fa. Byzerba)
- Mörser (Eigenbau)



Abbildung 5: Mörser zur Zerkleinerung von Knochenstücken, Anfertigung der Abteilung Feinmechanik des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München nach Plänen des Autors.

2.1.3.2. Herstellung des aufbereiteten Knochenextrakts für die HPLC

- 2 ml 0,2 M HCL
- 0,01 M NaOH
- 50 μ l 10 M NaOH
- 200 μ l 0,2 M Phosphorsäure (Apotheke Klinikum RDI)
- 250 μ l EDTA-Lösung (0,2 M EDTA, 0,2 M NaOH pH=10,3)
- 200 μ l eines Austauschharzes (AG 50W-X8 (K^+))
- 0,2 μ m Membran (Millipore)
- 1 Swinnex Membranhalter (Millipore)
- 10 μ l 10 M NaOH
- 1M KOH,
- Aqua bidest.

- 15 ml Spritze
- Feinwaage (Knochenproben zu 25 mg)

2.1.3.3. Nachweis von Bisphosphonaten im Knochen mittels komplexometrischer Verfahren

- 1,104 g Thoriumnitrathydrat
- 20ml 2,0 M Salpetersäure
- 500ml Aqua dest
- 0,744 g EDTA
- 10,1 ml EDA
- 25 % Salzsäure
- 50mg Xylenolorange
- Clondronat, Etidronat und Alendronat
- Knochenspäne
- 500 µm Knochenschnitt (Schnitt mit Diamantsäge)
- Ringerlösung

2.1.3.4. Schneiden von Knochenblöcken mit dem Cryostat

- Diamantsäge
- D-Hartmetallmesser (Fa. Leica)
- Crystatschneidegerät HM 500 O (Fa. Microm)
- Tesafilm
- Zigarettenpapier
- Polyvinylpyrrolidon
- Pinsel und Pinzette
- Objektträger

2.1.3.5. Schneiden von Kartoffelstücken mit dem Cryostat

- Skalpell
- Crystatschneidegerät HM 500 O (Fa. Microm)

- C-Messer für Cryostat (Fa. Leica)
- Objektträger
- Pinzette
- Pinsel

2.1.3.6. Nachweis Aktivität saurer Phosphatasen im Cryostatknochendünnschnitt

- Agar purum (Fa. Dade Boehringer)
- p-Nitrophenylphosphatlösung
(72 mg Natrium-4-Nitro-phenylphosphat-hexahydrat in 25 ml Acetatpuffer (pH=5,8))
- Objektträger
- 50 % Essigsäure
- 200µl Natriumnitrit (0,28g/100ml H₂O)
- 200µl Harnstoff (0,48g/ 100ml H₂O)
- 200µl N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin (0,38g/100ml)
- Aqua bidest.
- Kaisers Glyceringelatine
- 0,1 M Acetatpuffer (pH = 5,8)

2.1.3.7. Einbettung von Knochengewebe in Methyl-Methacrylat

- humane Knochenprobe (10x15x0,3mm)
- 10 % EDTA- Lösung
- Dampfdrucksterilisator
- 1,4% Paraformaldehyd-Lösung
- Ethanol (70-100%)
- Xylol
- Technovit 9100 (PMMA-Pulver, stabilisierte, Basislösung, Härter 1, Härter 2, Regler)
(Fa. Kulzer)
- Plastikgefäß, Luftdicht abschließbar
- Exikator
- Unterdruckpumpe
- Rotationsschleifgerät Planopol V (Fa. Struers)

- Säge
- gestoßenes Eis

2.1.3.8. Einbettung von Knochengewebe in Glycol-Metacrylat (Technovit™8100)

- humane Knochenprobe (15 x 10 x 2mm)
- Technovit 8100 (Basislösung, Härter I, Härter II) (Fa. Heraeus Kulzer)
- Einbettform aus Plastik
- Histoform Q/S (Fa. Heraeus Kulzer)
- Technovit 3040 (Fa. Heraeus Kulzer)
- PVC-Folie
- 1,4% para-Formaldehyd
- Phosphatpuffer (pH 7,4)
- Saccharose
- 100% Aceton
- Glasgefäße mit Deckel (Gurken oder Marmeladengläser)

2.1.3.9 Scheiden der MMA- Blöcke mit dem Polycut E

- Polycut E (Fa. Reichert- Jung bzw. Leica) mit Messerhalter A und Hartmetallmesser, 12 cm, Facettenwinkel 40°C
- Aceton 100%
- Pinsel
- Objektträger
- Kissolfolie
- Filterpapier in Streifen geschnitten
- Objektträgerpresse (Abb. 6)

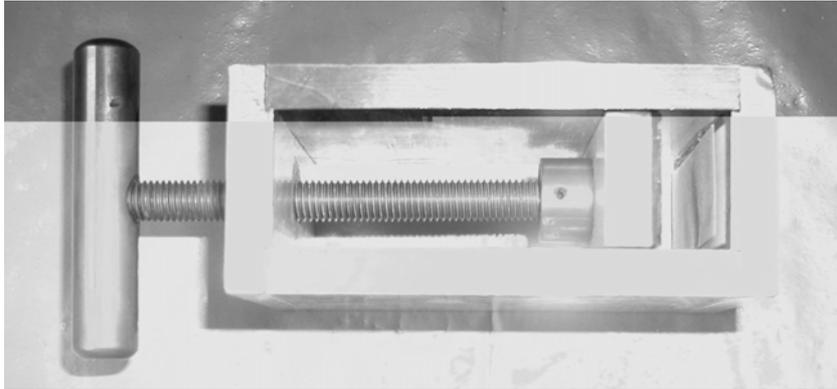


Abbildung 6: Objektträgerpresse zum Anpressen von Kunststoffdünnschnitten auf die Objektträger. Eigenbau des veterinäranatomisches Instituts der Ludwig-Maximilian Universität München

2.1.3.10. Histochemisches Anfärben der TRAP mittels Burstone`s Media

- 4 mg Naphtol AS-BI-phosphat
- 0,25ml N,N-dimethylformamid
- 25ml 0,2 M Acetat-Puffer (pH= 5,0)
- 35 mg Fast Red Violet LB
- Hellendahl Färbekasten

2.1.3.11. Direkte Azokupplung mit Naphtol-AS-BI-Phosphate und hexatotiisiertes Pararosanilin

- Pararosanilin
- Aqua bidest:
- HCl
- Natriumnitrit
- Naphtol-AS-BI- Phosphate
- Dimethylformamid
- L (+) - Tartrat
- 0,1 M Acetatpuffer
- Auf Objektträger gepressten Proben
- Karion F
- Deckgläser, Inkubationsgefäße für 10 Objektträger, Wärmeschrank
- Hellendahl Färbekasten

2.1.3.12. Pentachromfärbung nach Movat

- 2-Methoxyethylacetat
- 1 g Hämatoxin (Merck 4302)
- 1,16 g Eisenchlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 3943)
- 1 ml 25 %ige HCl
- 1 g Alcianblau 8 GS (Chroma 1A288)
- 0,1 g Brillant Crocein R (Chroma 1B109)
- 0,5 ml Eisessig
- 0,1 g Säurefuchsin (Merck 7629, Chroma 1B525)
- 6 g Saffron du Gâtinais (Chroma 5A394)
- 10 ml Ammoniumhydroxid (Ammoniak 25%)
- Phosphorwolframsäure 5%
- Isopropanol
- Xylol
- 70%, 96%, 100 %igem Ethanol
- Aqua dest

2.1.3.13. Bearbeitung der Schnitte nach dem Färbeprozess

- Ethanol 70% und 96%
- Isopropanol
- Xylol
- Aqua dest.
- Eukit
- Deckgläser
- Hellendahl Färbekasten

2.1.3.14. Spektrophotometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität in einer definierten Menge Knochen mittels p-Nitrophenylphosphat

- 1cm x 1cm x 0,5cm großes Knochenstück
- Skalpell

- Mörservorrichtung (Eigenbau)
- Feinwaage
- 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2
- Schüttelbank
- Filterpapier
- Eppendorfcups
- Zentrifuge
- 96V-Microtiterplatte
- L (+)- Tartrat
- 4-Nitrophenylphosphat-hexahydrat
- Aqua dest.
- saure Phosphatase Isoenzym V
- Wasserbad (37° C)
- Spektrophotometer Dynatec (bei 405 nm)

2.1.3.15. Immunologische Bestimmung der TRAP 5b-Aktivität in einer definierten Menge Knochen mittels TRAP-ELISA

- Bone TRAP Assay (Fa. Medac): Waschpuffer, Anti- TRAP- Antikörper, 1,0 U/l, 5,0 U/l, 10,0 U/l Standards, Kontrolle, Freisetzungsreagenz, Substratpuffer, Substrattabletten (p-Nitrophenylphosphat), Stopplösung, Mikrotiterplatte
- Aqua bidest.
- Natriumchloridlösung (NaCl, 0,9%)
- Mikroliterpipetten
- Multipette plus (Fa. Eppendorf)
- Easypet (Fa. Eppendorf)
- Sterile Einweg- Auslaufpipette 10ml, 25ml (Fa. Falcon)
- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplattenschüttler „Shaker Incubator“ Schüttelfrequenz 950 rpm
- Mikrotiterplatten-Photometer MR 7000 mit Filter für 405 nm (Fa. Dynatec)
- Computer Workstation mit Biolinx 2.20
- Eppendorf Thermomixer 2ml comfort
- Thermozyentrifuge Mikro 22R (Fa. Hettich)

2.2. Methoden zur Bestimmung von Bisphosphonaten im humanen Knochengewebe

2.2.1. Bearbeitung der Knochenzylinder und Knochenpäne

1. Nach dem Einbau der Totalhüftendoprothese wird der entnommene Hüftkopf bei -70°C aufbewahrt.
2. Mit der Bandsäge werden $1\text{cm} \times 1,5\text{ cm} \times 0,3\text{ cm}$ große Blöcke nach der unten beschriebenen Methode Zonen 1-3 herausgesägt (siehe Abb. 8 – Abb. 20) . Zone 1 entspricht einer variablen Region im spongiösen Kopfbereich, Zone 2 befindet sich im Bereich des Schenkelhalses und Zone 3 umschließt die intertrochantere Region, direkt am Absetzungsrand am Übergang zum Femurschaft.
3. Hierbei wird mit einer geringen Vorschubgeschwindigkeit gearbeitet, um Schneideartefakte zu vermeiden.

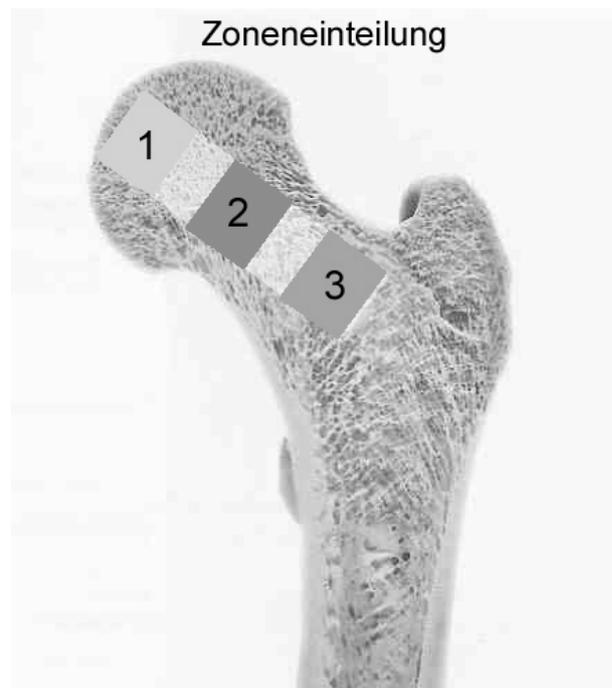


Abbildung 7: Einteilung des humanen Hüftkopfes in drei Zonen (Kopfzone1 , Schenkelhalszone 2 und intertrochantere Zone 3) zur lokal-spezifischen Entnahme der Knochenblöcke.



Abbildung 8: Blick auf die Hinterseite eines menschlichen Hüftkopfs, entnommen bei der Implantation einer Hüfttotalendoprothese



Abbildung 9: Entfernen des Kapselgewebes um nur Knochengewebe in die Messungen miteinzubeziehen



Abbildung 10: Sägen des Hüftkopfs in der Frontalebene mit einer Bandsäge (Fa. Bycerba)

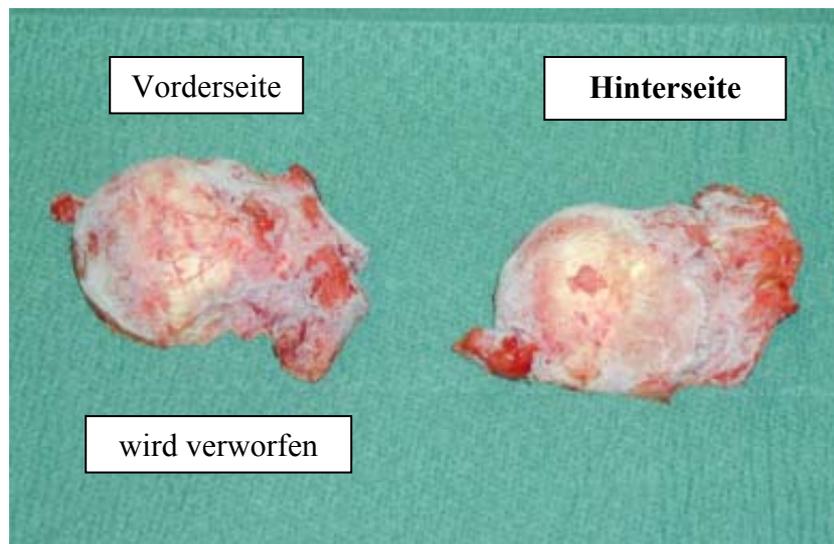


Abbildung 11: Um gleiche Bedingungen für alle Messungen zu erreichen, wird zur Auswertung nur der Knochen der Hinterseite herangezogen



Abbildung 12: Die Randbereiche des halben Hüftkopfs werden durch eine schräg-transversale Schnittführung abgetrennt.

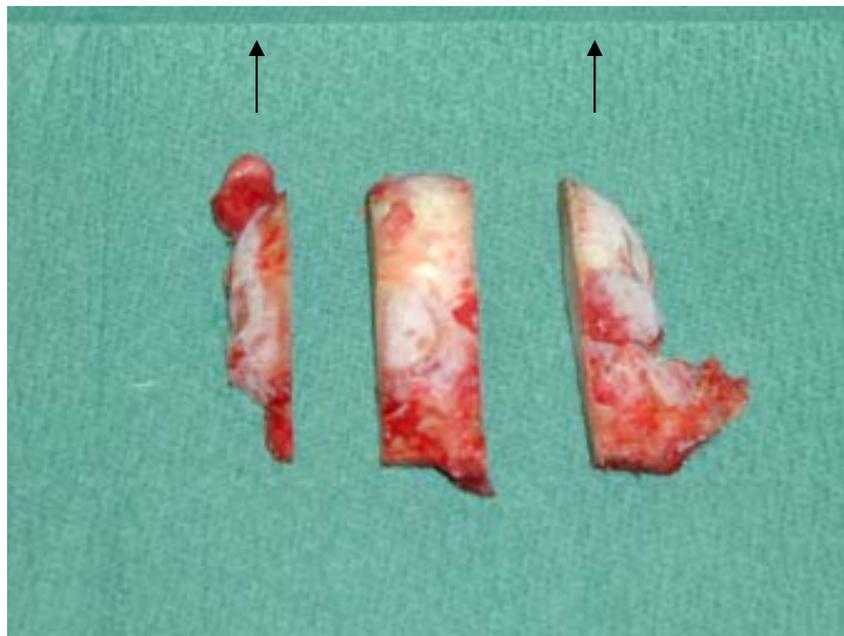


Abbildung 13: Die beiden Randstücke werden verworfen, das Mittelstück wird weiterverwendet.



Abbildung 14: Aufteilung des Mittelstücks durch schräg-sagittale Schnittführung in 5 Stücke

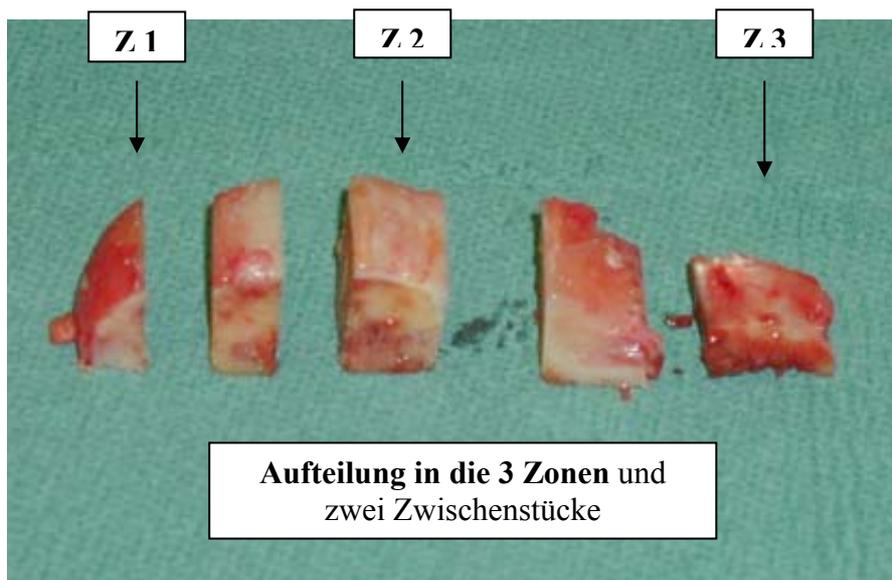


Abbildung 15: Die mit Pfeilen markierten Stellen entsprechen den drei Zonen

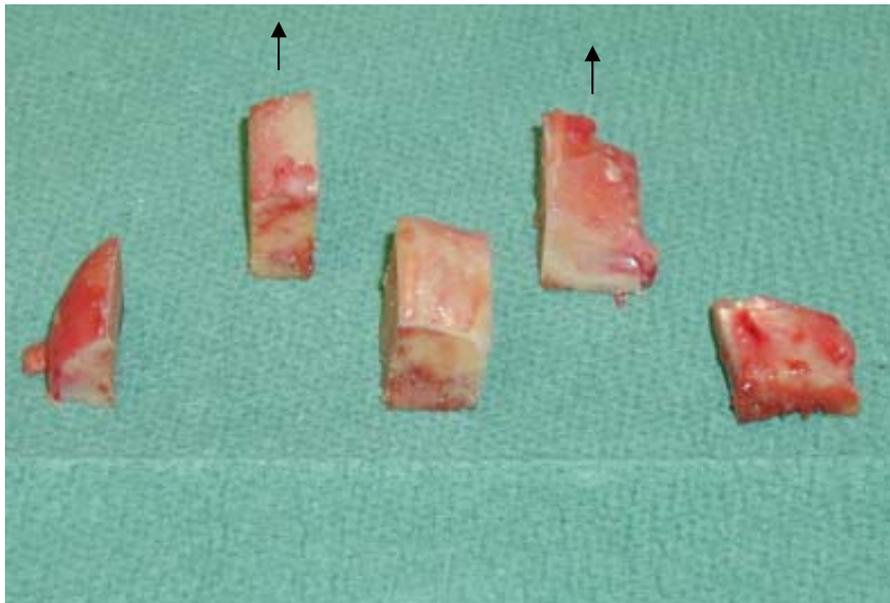


Abbildung 16: Die Mittelstücke werden verworfen

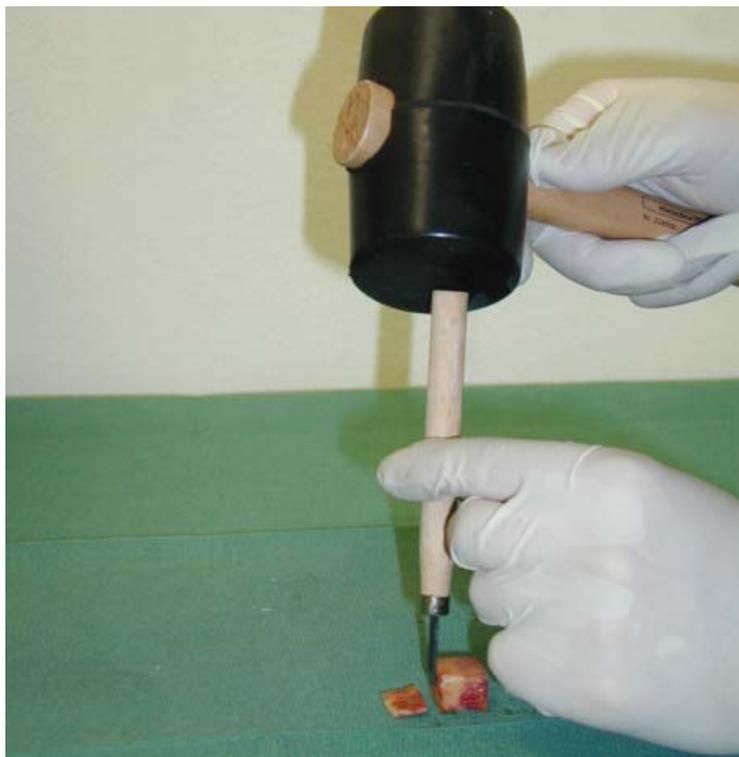


Abbildung 17: Entfernen des Knorpels von den Blöcken der drei Zonen

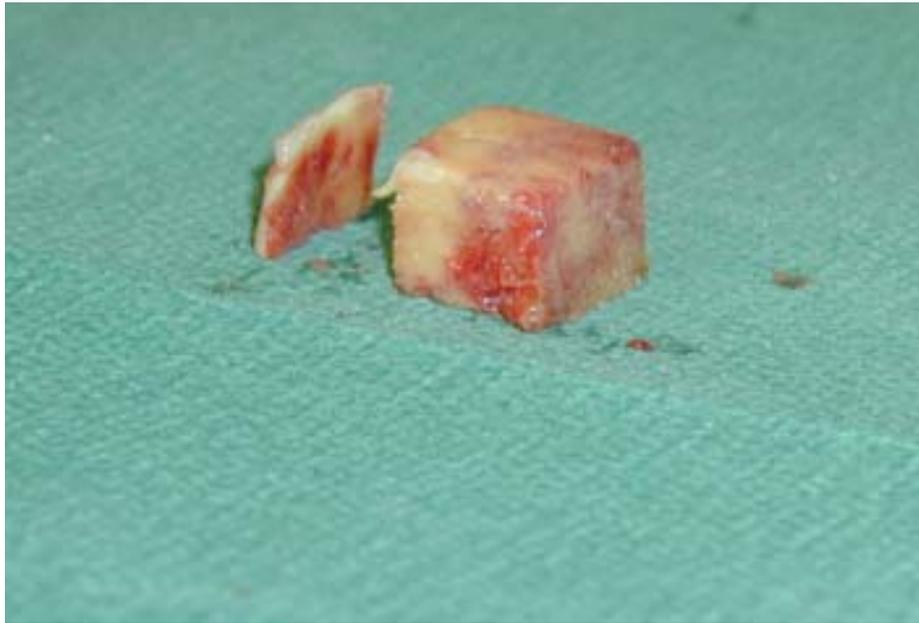


Abbildung 18: Knorpel- und Knochenschicht, verwerfen des Knorpelanteils



Abbildung 19: Zersägen des Knochenblocks in schräg-sagittaler Richtung

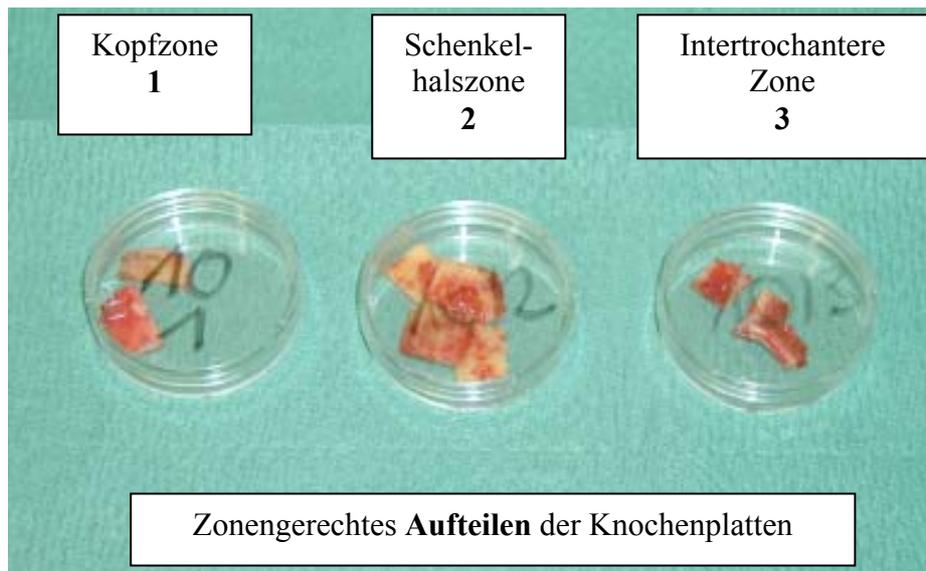


Abbildung 20: Aufteilen der Knochenchips je nach Zone in kleine Schalen

4. Die Knochenchips wurden entweder im Ganzen histologisch verarbeitet oder in einem Mörser (Abb. Nr. 3.2.5.) zu Knochenspänen zerkleinert, nachdem von diesen der knorpelige bzw. kapselige Anteil entfernt wurde.

2.2.2. Herstellung des aufbereiteten Knochenextrakts für den chromatographischen Nachweis des Bisphosphonats

1. Der Hüftkopf (Gruppe A oder B) wird in den Schraubstock eingespannt und mehrfach zersägt; die Knochenspäne werden mittels einer Vorrichtung aufgefangen, gesiebt, zu 25 mg Portionen abgewogen und dann mit 2 ml 0,2 M HCl versetzt.
2. Die Proben werden in einem Vortexer™ aufgeschüttelt und über Nacht inkubiert (20°C).
3. Nach Zentrifugation, werden 500µl-Portionen, welche jeweils 6,25 mg Knochen entsprechen, entnommen.
4. Diese werden mit 1ml 0,01 M NaOH alkalisiert und zur Ausfällung von Bisphosphonat mit Calciumphosphat wird 50 µl 10 M NaOH dazugegeben.
5. Nun wird die Probe dreimal zentrifugiert (10 min, 1000g) und von den aminhaltigen Resten mit 1 ml Wasser ausgewaschen.
6. Nach weiterer Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet mit den Kalziumsalzen in 200 µl 0,2 M Phosphorsäure aufgelöst.

7. Um das Kalzium zu entfernen, werden 250 µl EDTA-Lösung (0,2 M EDTA, 0,2 M NaOH (pH=10,3) hinzugegeben.
8. Danach werden 200 µl eines Austauscherharzes (AG 50W-X8) dazugegeben, welches zuerst wie folgt in eine K⁺-Form gebracht werden muss: 1M KOH wird im Verhältnis 3:1 zu dem Harz gegeben und 30 Sekunden vermischt; der Überstand wird dann verworfen. Dies wird 2mal wiederholt, dann wird das Harz 5mal mit Wasser gewaschen (Verhältnis 3:1). Für jeden Versuchsdurchgang wird das Harz mit Aqua bidest. (Verhältnis 3:1) aufgefüllt und am Ende 2-3mal ausgewaschen. Das Austauscherharz sollte bei +4°C in einer dunklen Box aufbewahrt werden.
9. Nach Schütteln und Zentrifugieren werden die 550 µl-Proben durch einen 0,2 µm Swinnex™ - Membranfilter gepresst und mit 10 µl einer 10 M NaOH- Lösung alkalisiert.
10. Diese Proben können nun 1 Woche bei + 4°C und über ein Monat bei – 20°C aufbewahrt werden.

2.2.3. Nachweis von Bisphosphonaten mittels komplexometrischer Methode

1. Herstellung der 4,0 mM Thoriumlösung:
1,104 g Thoriumnitrathydrat wird in 20ml 2,0M Salpetersäure aufgelöst und mit 500ml Aqua dest. verdünnt.
2. Herstellung der 4,0 mM EDTA-Lösung :
0,744 g EDTA werden in 500 ml Aqua dest. gegeben.
3. Herstellung der 0,6 M EDA-Lösung:
10,1 ml EDA werden in eiskaltes Wasser gegeben, dann langsam mit 15 ml konzentrierte Salzsäure versetzt. Dabei wird die Temperatur immer unter 20°C gehalten und dann der pH mit Salzsäure auf 7,3 eingestellt und noch mit 250 ml Aqua dest. verdünnt.
4. Herstellung der 0,05% Xylenol-Indikatorlösung:
50 mg Xylenolorange werden in 100 ml Wasser aufgelöst.
5. Nun wird 2ml (0,4 mM) der Thoriumlösung zu 4ml der 0,4 mM EDTA-Lösung gegeben und der pH von 6,0-6,3 mit 1ml 0,6 M EDA-Pufferlösung und der notwendigen 0,1M Salzsäure an der Elektrode eingestellt und 0,3 ml Xylenol-Orangelösung hinzugegeben.

4. Vor dem Schneiden mit einem D-Hartmetallmesser (Messerneigung 10°) wird ein, in Polyvinylpyrrolidon getränktes, Zigarettenpapier oder ein Tesafilmstreifen auf der Oberfläche des Knochenblocks befestigt und soll gut anfrieren.
5. Nun wird mit einer gleichmäßigen Rotationsbewegung ein Schnitt von $10\ \mu\text{m}$ Dicke vom Knochenblock abgenommen.
6. Vom Zigarettenpapier oder Tesafilmstreifen wird nun der Schnitt auf einen Objektträger übertragen.

2.2.5. Schneiden von Kartoffelstücken mit dem Cryostat

1. Das C-Messer wird 30 min vor dem Schneiden auf -24°C abgekühlt.
2. Das Kartoffelgewebe wird mit einem Skalpell in einen $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ grossen Block geschnitten und mit Superfrost™ auf dem Präparathalter befestigt.
3. Nun schneidet man sich in das Präparat, bis man die gewünschte Tiefe erreicht hat, aus der die Schnitte entnommen werden soll, stellt dann ein Schichtdicke von $40\ \mu\text{m}$ ein und versucht nun mit gleichmässigen und langsamen Rotationsbewegungen das Gewebe zu schneiden.
4. Der Schnitt wird nun mit einer Pinzette entrollt und auf einem Objektträger ausgebreitet.
5. Für die im nachfolgendem beschriebene, histochemische Färbung der sauren Phosphatase wird das Reaktionsmedium nur aufgetropft, um ein abschwimmen zu vermeiden.

2.2.6. Nachweis der sauren Phosphatase im Cryostatknochendünnschnitt

1. In einem kochenden Wasserbad wird der Agar purum (Dade Boehringer) in $0,1\ \text{M}$ Acetatpuffer (pH 5,8) aufgelöst.
2. Nun wird die p-Nitrophenylphosphatlösung (72 mg Natrium-4-Nitro-phenylphosphat-hexahydrat in 25 ml Acetatpuffer (pH 5,8)) im Verhältnis 1:1 bei 37°C zur Agar-lösung gegeben und gemischt.
3. Ein $200\ \mu\text{m}$ -dünner Film der Lösung wird auf eine $2,0 \times 2,5\ \text{cm}$ große Fläche eines Objektträgers gegeben, indem $100\ \mu\text{l}$ der Agar-Puffersubstratlösung aufpipettiert werden.

4. Der Knochendünnschnitt wird nun auf diese Schicht aufgelegt und bei 37°C für 120 min inkubiert.
5. Nach Stoppen der Reaktion mit 50% Essigsäure werden folgende Reagenzien zu je 200µl zu den entsprechenden Zeiten pipettiert:

0 sec :	200µl Natriumnitrit	(0,28g/ 100ml H ₂ O)
60 sec :	200µl Harnstoff	(0,48g/ 100ml H ₂ O)
120 sec :	200µl N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin	(0,38g/ 100ml H ₂ O)
180 sec :	Die Objektträger werden für 60 sec in Aqua dest. gelegt.	

Zuletzt werden die Knochenschnitte mit Kaisers Glyceringelatine bedeckt.

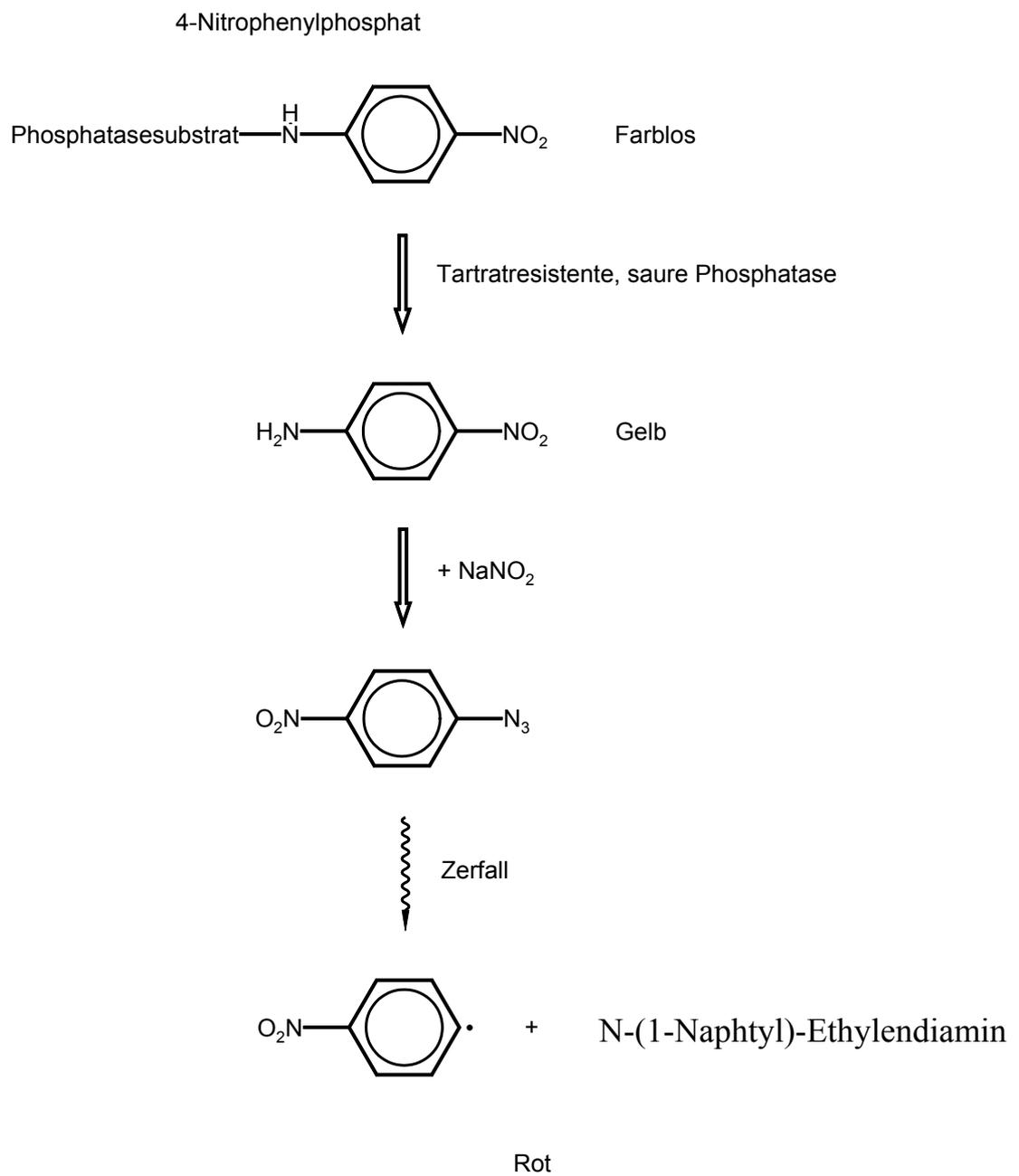


Abbildung 22: Chemische Diazotierungsreaktion nach enzymatischer Spaltung des 4-Nitrophenylphosphat

2.2.7. Einbettung von Knochengewebe in Methyl-Methacrylat (Technovit™9100)

Versuchsgruppen:

Gruppe I₁₋₃ : humane Knochenprobe (10 x 15 x 3mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat, unentkalkt, Entnahme aus den Zonen 1-3

Gruppe II₁₋₃: humane Knochenprobe (10 x 15 x 3mm) mit eingelagertem Bisphosphonat, unentkalkt, Entnahme aus den Zonen 1-3

Gruppe III : humane Knochenprobe (10 x 15 x 3mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat
48 h entkalkt in 10% EDTA- Lösung, keine spezifische Entnahmestelle

Gruppe IV : humane Knochenprobe (10 x 15 x 3mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat unentkalkt, autoklaviertes Gewebe

Gruppe V : Kontrollgewebe (10x 15x 3mm), bekannte Aktivität der sauren tartrat-empfindlichen Phosphatase, wie Kartoffel

	I	II	III	IV	V
Fixation 6 h	I α_{1-3}	II α_{1-3}	III α	IV α	V α
Fixation 12 h	I β_{1-3}	II β_{1-3}	III β	IV β	V β
Fixation 24 h	I χ_{1-3}	II χ_{1-3}	III χ	IV χ	V χ
Dehydratation kurze Sequenz	I δ_{1-3}	II δ_{1-3}	III δ	IV δ	V δ
Dehydratation lange Sequenz	I ϵ_{1-3}	II ϵ_{1-3}	III ϵ	IV ϵ	V ϵ

Tab. 2: Stufenweise Probenvorbereitung für Kunststoffeinfettung (Fixierung/Entwässerung)

Anmerkung: Die fettmarkierten Versuchsdurchführungen werden als Standard verwendet und zeigten letztlich auch die besten Ergebnisse.

Versuchsprotokoll:

1. Zuerst werden die Knochenproben (10 x 15 x 0,3mm) in 1,4% Paraformaldehyd-Lösung für 6h, 12h und 24h bei + 4°C fixiert.
2. Die Dehydratation erfolgt in einer aufsteigenden, kurzen (δ) oder aufsteigenden, langen (ϵ) Alkoholreihe :

Stufe	Lösung	Konzentration	Zeit
Entwässerung 1	Ethanol	70%	1h
Entwässerung 2	Ethanol	80%	1h
Entwässerung 3	Ethanol	96%	1h
Entwässerung 4	Ethanol	96%	1h
Entwässerung 5	Ethanol	100%	1h
Entwässerung 6	Ethanol	100%	1h
Entwässerung 7	Ethanol	100%	1h

Tab. 3: Stufenweise Probenvorbereitung für Kunststoffeinfettung (Entwässerung)

Zum Vergleich werden die Proben auch in einer kurzen Alkoholreihe (δ) entwässert, welche die Entwässerungsstufen 1-4 für je 1h beinhaltet. Die verschiedenen Ethanolbäder sind auf + 4 °C abgekühlt und stehen während der Entwässerung auf gestossenem Eis. Im Bad selben schwimmt ein, in einer Spezialvorrichtung gefangener, Rührmagnet.

1. Zur Entfettung werden die Proben für 2h in ein Intermedium (Xylol) gelegt
2. Um nun die Stammlösung A herzustellen werden in 500ml Messkolben 80g PMMA-Pulver gegeben und mit 400ml entstabilisierter Basislösung aufgefüllt. Nachdem sich das Pulver unter Rühren aufgelöst hat, werden 4 g des Härter 1 dazugegeben. Nach weiterem Einrühren wird der Messkolben auf 500ml mit der entstabilisierten Basislösung aufgefüllt.
3. Für die Stammlösung B werden in einen 50 ml Messkolben 4ml Härter 2 vorgegeben und dann 30ml entstabilisierter Basislösung dazugeschüttet. Anschließend rührt man 2 ml Regler ein und füllt den Kolben mit Basislösung auf. Die Lösung wird nun in

einer Braunglasflasche verschlossen und kann etwa 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

4. Für die Präinfiltrationslösung werden 200ml noch stabilisierte Basislösung zu 1g Härter 1 gegeben und die Proben bei Raumtemperatur etwa 1 h präinfiltriert. Eventuell kann auch ein zweiter Präinfiltrationsgang durchgeführt werden. Die Lösung selbst kann bei Raumtemperatur ca. 1 Woche aufbewahrt werden.
5. Für die Infiltration werden nun 200ml entstabilisierte Basislösung in eine 250 ml Messkolben gegeben und 20g PMMA-Pulver eingerührt. Dann werden 2 g Härter 1 hinzugegeben und der Kolben mit Basislösung aufgefüllt. Nun werden Knochenproben in Formen gegeben und mit Infiltrationslösung aufgefüllt und inkubieren bei 4°C 24h. Die Infiltrationslösung selbst kann bei 4°C ca. 1 Woche aufbewahrt werden.
6. Damit das Präparat gut und mittig im Kunststoff liegt, werden zuerst Böden in die Einbettformen gegossen. Hierzu werden nun 9 Volumenteile Stammlösung A zu 1 Volumenteil Stammlösung B in einem Becherglas gemischt und die Einbettformen bis knapp unter den Rand aufgefüllt und verschraubt. Nach etwa 8 Stunden ist der Kunststoff auspolymerisiert und man versucht nun die noch flüssige Phase des Acrylats mit einem Spatel abzutragen.
7. Zur Polymerisation der Präparate werden nun wieder 9 Volumenteile Stammlösung A zu 1 Volumenteil Stammlösung B in einem Becherglas gemischt, die Proben in den weichen Anteil des Boden gedrückt, mit dem flüssigem Kunststoff übergossen und in einem vorgekühltem Exsikator für 10 min bei 800 bar evakuiert. Dann muss die Einbettformen luftdicht verschlossen werden und für 24h bei + 4° C belassen werden.
8. Die hartgewordenen Kunststoffblöcke werde aus der Einbettform herausgesägt und die Blöcke auf dem Rotationsschleifgerät bis zum Beginn des Objekts heruntergeschliffen
9. Um die runden Kunststoffblöcke gut in der eckigen Einspannvorrichtung des Polycuts fixieren zu können, werden an zwei Stellen parallele Kanten geschliffen.

2.2.8. Einbettung von Knochengewebe in Glykol-Metacrylat (Technovit™8100)

Versuchsgruppen :

Gruppe I₁₋₃ : humane Knochenprobe (10 x 15 x 2mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat, unentkalkt, Entnahme aus den Zonen 1-3

Gruppe II₁₋₃: humane Knochenprobe (10 x 15 x 2mm) mit eingelagertem Bisphosphonat, unentkalkt, Entnahme aus den Zonen 1-3

Gruppe III : humane Knochenprobe (10 x 15 x 2mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat 48 h entkalkt in 10% EDTA- Lösung, keine spezifische Entnahmestelle

Gruppe IV : humane Knochenprobe (10 x 15 x 2mm) ohne eingelagertes Bisphosphonat unentkalkt, autoklaviertes Gewebe

Gruppe V : Kontrollgewebe (10 x 15 x 2mm), bekannter Aktivität der sauren tartratempfindlichen Phosphatase, wie Kartoffel

Versuchsprotokoll:

Falls nicht anders angegeben werden alle Versuchsschritte bei 4°C durchgeführt.

1. Fixation

Zuerst werden die Knochenproben (10x15x0,3mm, siehe 3.2.1.) in 1,4% phosphatgepuffertem Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,4) für 6h oder 12 h fixiert und dann über Nacht in einem Phosphatpuffer (pH 7,4) mit einem Zusatz von 6,8% Saccharose ausgewaschen.(Alternativfixation: 2,5% Glutaraldehydlösung, gepuffert durch 2,5% Cacodylatpuffer (pH 7,4) und 7% Saccharose)

2. Entwässerung

Die Knochenproben werden nun in 100% Aceton für 60 Minuten entwässert, wobei am Anfang das Aceton so lange gewechselt wird bis es klar bleibt. (Alternativ: Die entkalkten Knochenproben werden nun in eine aufsteigende dreistufige Aceton oder Ethanol-Reihe beginnend mit 50%, 75% und 95% mit je zwei Wechseln- immer für 15 Minuten gegeben.)

3. Infiltration

Nun mischt man 100 ml Basislösung mit 0,6g Härter I (1 Beutel) und infiltriert die Proben für etwa 6-10 Stunden.

4. Polymerisation

Nun werden 15ml der Infiltrationslösung von (100 ml Basislösung + 0,6g Härter I) mit 0,5 ml Härter II vermischt und die Proben darin 5 Minuten bewegt. Dann werden die Proben in den Einbettformen ausgerichtet und mit dieser Lösung bis zum Rand übergossen. Die bis zum Rand gefüllte Form wird mit einer Folie luftdicht abgeschlossen und auf Eis in den Kühlschrank gestellt. Die Polymerisationszeit beträgt hierbei etwa 3-6 Stunden bei einer maximalen Polymerisationstemperatur von 11°C.

2.2.9. Scheiden der MMA- Blöcke mit dem Polycut E

1. Die Blöcke werden sehr fest in Spannvorrichtung eingespannt und die Höhe des Blocks ein wenig unter die Ebene des Messers eingestellt.
2. Anschließend wählt man ein Programm mit etwa 50 mal 10 µm an und schneidet sich so in das Präparat.
3. Ist man auf Höhe des Präparats, schneidet man mit 5µm Schnittdicke und einer Vorlaufgeschwindigkeit des Mikrotoms von 1,5 mm/s, zieht den Schnitt mit einem mit Azeton angefeuchteten Pinsel auf die Messeroberkante und von dort auf einen mit Azeton befeuchteten Objektträger.
4. Die ausgerichteten Schnitte werden mit einer Kissolfolie und dann einem Filterpapier bedeckt.
5. Die Schnitte werden in eine Presse gegeben und 14 Tage bei 37°C gepresst.
6. Dann werden die Schnitte 1 Stunde in 100% Methoxymethylacetat gegeben anschließend in 70% Ethanol für 5 min, dann in 40 % Ethanol für 5 min und in Aqua dest..

2.2.10. Histochemisches Anfärben der TRAP mittels Burstone`s Media

1. 4 mg Naphtol AS-BI-phosphate werden in 0,25ml N,N-dimethylformamid aufgelöst und dazu werden 25ml 0,2 M Acetat-Puffer (pH= 5,0) , 35 mg Fast Red Violet LB als Kopplungsreagenz und zwei Tropfen (60µl) MgCl₂ gegeben.
2. In je 25 ml dieses gefiltertem Mediums werden nun bei 37°C verschiedene Konzentrationen von L(+)-Tartrat (1, 32,5, 50, 100 mM) hergestellt.

3. Mit diesen Lösungen werden nun die Knochenschnitte bei Raumtemperatur zwischen 30 min bis 3 Stunden inkubiert.
4. Dann werden die Schnitte 30 min in fließendem Wasser gereinigt, bei 25°C getrocknet und mit 1% Fast Green FCF für 1 min gegengefärbt und dann eingedeckt.

2.2.11. Direkte Azokupplung mit Naphtol-AS-BI-Phosphate und hexatotisiertes Pararasoanilin

Methode nach Lojda et al. , 1964; Barka et al., 1962 :

Herstellung des hexatotisierten Pararasoanilin

1. 400 mg Pararosanilin werden in 8 ml Aqua bidest. aufgelöst und auf 10 ml mit HCl aufgefüllt. Dies sei Lösung A. Sie ist praktisch unbegrenzt haltbar.
2. Nun löst man 4 g Natriumnitrit in 100 ml Aqua bidest. auf . Diese Lösung B sollte wöchentlich erneuert werden.
3. Man mische nun vor Anwendung Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1.

Herstellung der Substratlösung

25 mg Naphtol-AS-BI- Phosphate werden in 1 ml Dimethylformamid aufgelöst und mit Acetatpuffer (pH 5,2) zu 25 ml aufgefüllt. Darin werden nun 500 mg L (+) - Tartrat aufgelöst.

Herstellung des Inkubationsmediums

1. 1,5 – 4.5 ml des hexatotisierten Pararasoanilin werden mit 0,1 M Acetatpuffer auf 25 ml aufgefüllt.
2. Diese Lösung (25 ml) wird mit der Substratlösung (25 ml) vermischt.

Proben:

1. Die auf Objektträger gepressten Proben werden nun 150 Minuten bei 37 °C im Inkubationsmedium unter zeitweiligem Schütteln belassen. Bei stattfindender Reaktion bilden sich Gasblasen.

2. Anschließend werden die Schnitte mehrfach in Aqua bidest. gewaschen.
3. Die Schnitte werden mit Karion F eingedeckt und mittels Deckglas verschlossen

2.2.12 Pentachromfärbung nach Movat

1. Herstellung der Lösungen:

Weigertsches Eisenhämatoxin:

Lösung A: 1 g Hämatoxin in 100 ml 96%igem Ethanol lösen und reifen lassen, bis Farbe rotbraun.

Lösung B: 1,16 g Eisenchlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;) und 1 ml 25 %ige Hcl in 100 ml Aqua dest. lösen.

Lösung A und B 1:1 mischen. Lösung B zuerst!

Nicht länger als 8 Tage haltbar!

Alcianblau:

1 g Alcianblau 8 GS wird in 1 ml Eisessig und 100 ml Aqua dest. gelöst.

Brillant Crocein-Säurefuchsin:

Lösung A: 0,1 g Brillant Crocein R wird in 0,5 ml Eisessig und 99,5 ml Aqua dest. gelöst.

Lösung B: 0,1 g Säurefuchsin wird in 0,5 ml Eisessig und 99,5 ml Aqua dest. gelöst.

Gebrauchslösung: 8 Teile Lösung A und 2 Teile Lösung B werden vermischt. Die Lösung ist mehrere Monate haltbar.

Saffron du Gâtinais:

6 g Saffron du Gâtinais werden in 100 ml 100 %igem Ethanol gelöst und vor Gebrauch in luftdicht geschlossener Flasche für 48 Std. bei 50° C im Brutschrank extrahiert.

Unter Luftabschluß haltbar.

Alkalischer Ethanol:

10 ml Ammoniumhydroxid (Ammoniak 25%) auf 90 ml 96 %igem Ethanol

2. Färbanleitung:

Nachfolgende Punkte werden Schritt für Schritt durchgeführt. Die Objektträger werden in einem Objektträgerhalter jeweils für die angegebene Zeit in dem Färbekasten mit der jeweiligen Lösung inkubiert oder einfach nur abgespült:

- 2-Methoxyethylacetat für eine 1h
- 96% Ethanol, 70% Ethanol
- Aqua dest. für je 5 min
- Alcianblau 1% für 10 Minuten
- Aqua dest. für 5 Minuten
- alkalischer Ethanol für eine Stunde
- Leitungswasser, fließend für 10 Minuten
- dann mit Aqua dest. abspülen
- Eisenhämatoxilin nach Weigert für 10 Minuten
- dann mit Aqua dest. abspülen
- Wässern in Leitungswasser für 15 Minuten
- Brillant Crocein – Säurefuchsin für 10 bis 15 Minuten
- mit Essigsäure 0,5 % abspülen
- Phosphorwolframsäure 5% für 20 Minuten
- Essigsäure 0,5 % für 2 Minuten
- 3 x Ethanol 100% für je 5 Minuten
- Saffron du Gâtinais für 60 Minuten
- Isopropanol für 2 Minuten
- 2 x Xylol ⇒ eindecken in Eukitt

2.2.13. Bearbeitung der Schnitte nach dem Färbeprozess

1. Die Schnitte werden für 5 min in ein leicht zirkulierendes Wasserbad gegeben.
2. Dann werden diese für je 5 min zuerst in 70% Ethanol, dann in 96% Ethanol, dann zweimal in Isopropanol und zweimal in Xylol gegeben.
3. Die lufttrockenen Schnitte werden nun mit Eukitt überdeckt und mit einem Deckglas bedeckt.

2.2.14. Spektrophotometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität im Knochen mittels enzymatisch-chemischer Methode

Stammlösungen:

1. L (+)- Tartrat- Lösung 1 M:
15 g Tartrat werden in 70 ml Wasser aufgelöst, der pH auf 5,2 eingestellt und dann auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist etwa ein Monat haltbar.
2. Gepufferte p- Nitrophenylphosphatlösung
36 mg 4-Nitrophenylphosphat-hexahydrat werden in 12,5 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2 aufgelöst. Die Lösung sollte immer frisch zu bereitet werden oder im gefrorenen Zustand gelagert werden.
3. Gepufferte p- Nitrophenylphosphat- Tartrat- Lösung:
36 mg 4-Nitrophenylphosphat-hexahydrat werden in 12,5 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2 aufgelöst, dazu werden 250 µl 1M L (+)- Tartrat- Lösung gegeben und vermischt. Lösung sollte immer frisch zu bereitet werden oder im gefroren Zustand gelagert werden.
4. Enzymlösung:
2 mg der sauren Phosphatase V werden in 1ml Wasser aufgelöst.
Dabei entsteht eine Lösung mit der Aktivität 0,5 Unit/ml. Die Lösung sollte immer frisch zu bereitet werden oder im gefroren Zustand gelagert werden.

Erstellung der Eichkurve:

Aus Gründen der Genauigkeit muss die Eichkurve für jeden Messvorgang erneut aufgestellt werden:

1. Leerprobe:
In zwei Eppendorfcups werden 0,5 ml der gepufferten p- Nitrophenylphosphat- Tartrat- Lösung oder 0,5 ml der gepufferten p- Nitrophenylphosphatlösung pipettiert und im Wärmeschrank auf 37° C erwärmt.
2. Enzymlösungen:
In sechs Eppendorfcups wird die Enzymlösung (0,5 U) zweimal in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:10 pipettiert.

3. Dazu wird jeweils 0,5 ml der gepufferten p- Nitrophenylphosphat-Tartrat- Lösung oder 0,5 ml der gepufferten p- Nitrophenylphosphatlösung gegeben, dann werden die Proben in den Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.
4. 100µl der Enzymlösungen und der Leerwerte werden nach 60 min in je ein Val einer Microtiterplatte pipettiert und die Extinktion zum Zeitpunkt 90 min mit dem Spektrometer bei 405 nm abgelesen
5. Die vier Extinktionsswerte werden nun gegen die Enzymaktivitäten in ein Koordinatensystem eingetragen.

Probenvorbereitung:

1. Aus der Zone 1,2 und 3 des Hüftkopfes wird ein 1cm x 1cm x 0,5cm großes Knochenstück mit sowohl trabekulären, als auch kortikalen Anteilen ausgesägt. Der Knorpel sollte dann möglichst vollständig mit einem Skalpell abgetragen werden.
2. Das Knochenstück wird nun in einem Mörser gemahlen und das Mehl zu 20 – 40 mg Portionen in Eppendorfcups abgewogen. Hierbei werden pro Knochenzone 10 Proben abgewogen

Quantitative Analyse der Knochenproben:

1. Von den 12 abgewogenen Knochenportionen pro Knochenzone werden nun 8 Stück mit 0,5 ml p-Nitrophenylphosphat-Tartratlösung (pH 5,2) vermischt und 5 min auf einer Schüttelbank vermischt.
2. Anschließend werden die Proben in einem Wärmeschrank für 60 min bei 37°C inkubiert, dann bei 13000 U/min zentrifugiert und 50µl des Überstandes abpipettiert und in ein mit 50µl Acetatpuffer pH 5,2 gefülltes Vial einer Mikrotiterplatte gegeben.
3. Zum Zeitpunkt 90 min wird nun die Extinktion mit dem Photometer abgelesen.

2.2.15. Immunologische Bestimmung der TRAP 5b-Aktivität im Knochen mittels TRAP-ELISA

Ansetzen der Reagenzien:

1. Zur Verwendung des Diagnostik- Kits ist eine Proben Anzahl von 96 Proben abzüglich der benötigten Mikrotitervertiefungen für die Standards und der Kontrollen empfehlenswert.
2. Ansetzen des Waschpuffers:
1 Teil Waschpuffer (25x) wird mit 24 Teilen Aqua bidest. angesetzt
3. Ansetzen der Anti- TRAP- Antikörperlösung:
Rekonstitution mit 10,5 ml Aqua bidest., bei einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten
4. Ansetzen der 1,0 U/l, 5,0 U/l, 10,0 U/l Standards:
Rekonstitution mit je 0,5 ml Aqua bidest., bei einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten.
5. Ansetzen der Kontrolle:
Rekonstitution mit 0,5 ml Aqua bidest., bei einer Rekonstitutionszeit von 15 Minuten
6. Ansetzen der Substratlösung:
Es wird eine Substratablette in 5 ml Substratpuffer gelöst.

Vorbereitung der Proben:

1. Die Knochenstücke werden mit dem Mörser in gleichmässig feine Stücke zermahlen.
2. In Eppendorfcups werden dann 20-40 mg Portionen abgewogen und beschriftet
3. Die Proben werden mit 500 µl Natriumchloridlösung (Na Cl, 0,9%) versetzt und 10 Minuten mit einem Schüttler vermischt.
4. Die Proben inkubieren nun 7 Tage bei + 4°C.
5. Die Proben werden 4 min bei 1050 U/min und 20°C in einen Thermomixer gegeben.
6. Die Proben werden 4 min bei 20150 U/min und 20°C zentrifugiert.
7. 100 µl des Überstands wird zur Analyse verwendet.

Arbeitsvorschrift des Assays:

1. Die Mikrotiterplatte wird geöffnet und die Vertiefungen werden mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen und kräftig mit der Hand ausgeschleudert.
2. In jede Vertiefung wird 100 μ l Anti- TRAP-Antikörperlösung pipettiert und die Platte dann bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln (950 rpm) inkubiert.
3. Nach der Inkubation werden die Mikrotitervertiefungen viermal mit jeweils 300 μ l Waschpuffer ausgewaschen und die ganze Platte auf Filterpapier ausgeklopft. Dabei ist auf ein sofortiges weiterarbeiten zu achten, die Vertiefungen dürfen nicht austrocknen.
4. Nun werden jeweils 100 μ l Natriumchloridlösung (Na Cl, 0,9%) als Kontrolle, 100 μ l der Standards , der Kontrolle, sowie der Überstände der Proben in die Vertiefungen pipettiert
5. Anschließend werden 50 μ l Freisetzungsreagenz in jede Vertiefung pipettiert.
6. Erneut wird die Platte bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln (950 rpm) 60 min inkubiert.
7. Nach der Inkubation werden die Mikrotitervertiefungen wieder viermal mit jeweils 300 μ l Waschpuffer ausgewaschen und die ganze Platte auf Filterpapier ausgeklopft. Dabei ist auf ein sofortiges weiterarbeiten zu achten, die Vertiefungen dürfen nicht austrocknen.
8. In jede Vertiefung werden 100 μ l Substratlösung pipettiert und Platte dann bei 37°C über 60 Minuten im Wärmeschrank inkubiert.
9. Anschließend wird durch Zugabe von 25 μ l Stopplösung in jede Vertiefung die Reaktion gestoppt, die Platte ist dann leicht zu schütteln.
10. Die Platte wird in dem Photometer gegen 405 nm vermessen.

Testauswertung und Testbeurteilung:

1. Von allen Werten muss die Extinktion der Kontrolle abgezogen werden.
2. Die Mittelwerte der Standards, sofern Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, müssen bestimmt werden und mittels einer linearen Regression als Eichkurve in ein Koordinatensystem eingezeichnet werden.

3. Jedem einzelnen Test liegt ein Chargenblatt bei, welchem die Sollwertbereiche für die Standards und die Kontrolle in U/l entnommen werden können. Liegen die Werte in den entsprechenden Bereichen gilt der Test als valide.

3. Ergebnisteil

3.1. Direkter Nachweis von Clodronat mittels Thorium-Xylenolorange

Vermischt man 0 μl , 10 μl , 50 μl , 100 μl und 500 μl Clodronatlösung mit je 2ml der Indikatorlösung A (Thorium-Xylenolorange), so ergibt sich ein kontinuierlich ansteigendes Farbspektrum (Abb. 23). Je höher die Clodronatkonzentration ist, desto stärker ändert die Indikatorlösung ihre Farbe von violett in gelb. Die gelbe Farbe entsteht durch die Komplexbildung des Xylenolorange mit dem Clodronat (Abb. 23). Inkubiert man 50 mg Knochenspäne über Nacht mit 1ml Clodronatlösung, so verfärben auch diese Knochenspäne nach längerem Ausspülen (10 min im Wasserbad) die Indikatorlösung. Im Vergleich zur Kontrollprobe kommt es zu einer Änderung der Farbe von violett nach gelb (Abb. 24).

Versucht man diese Tests mit den Bisphosphonaten Etidronat, Alendronat und Ibandronat durchzuführen, stellt man fest, dass sich Etidronat, Alendronat und Ibandronat nicht mit Thorium-Xylenolorange reagieren.



Abbildung 23: Clodronat in den Mengen 0 μl , 10 μl , 50 μl , 100 μl und 500 μl vermischt mit Thorium-EDTA-Xylenolorangelösung

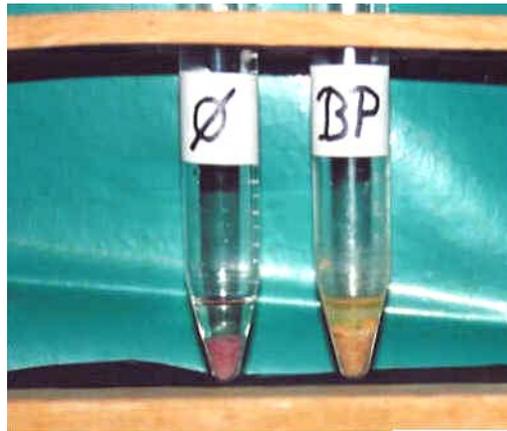


Abbildung 24: Knochenpäne zeigen nach Inkubation mit Clodronat und anschließendem Waschvorgang eine gelbe Farbe

3.2. Direkter Nachweis von Alendronat in humanem Knochen mittels HPLC

Die Probe wurden nach oben beschriebener Methode vorbereitet und anschließend dem Deutschen Institut für Lebensmittelchemie in Garching geschickt. Dort wurden die Proben mittels chromatographischen Techniken (Ninhydrin-Detektion) weiterverarbeitet:

Probe	<i>Nachweis möglich</i>	<i>Nachweisteknik</i>
A	nein	HPLC mit Derivatisierung
B	nein	HPLC mit Derivatisierung
C	nein	HPLC mit Derivatisierung
E	nein	HPLC mit Derivatisierung
Kontrolle A (P7 + Alendronat)	ja	HPLC mit Derivatisierung
Kontrolle B (P7)	nein	HPLC mit Derivatisierung

Tab. 3: Mit HPLC/Ninhydrindetektion vermessene Proben

Die Daten zeigen, dass nur in Proben, denen vor Auflösen in Salzsäure (s. 2.2.2.) kleine Mengen von Alendronat zugefügt wurde (Kontrollen), Bisphosphonatmoleküle nachgewiesen werden konnten. In den Hüftköpfen selbst konnte nach 50tägiger Therapie kein Alendronat nachgewiesen werden.

3.3. Histochemischer Nachweis der TRAP in Gefrierschnitten

Um das Gewebe möglichst nativ zu erhalten, wurde anfangs versucht das Knochengewebe mittels eines Cryotoms zu schneiden. Die war nur mit einem Cryotom mit Schneidemotor möglich, der einen langsamen und gleichmäßigen Schneidevorgang ermöglicht. Der Block wurde vor dem Schneidevorgang mit einem Tesafilm überzogen und der Schnitt dann auf diesem Film abgezogen. Die Problem der Fixation des Schnittes und die anschließende Färbung auf dem Objektträger wurde dadurch gelöst, dass der Objektträger vorher mit einer Agarschicht, welche das chromogene Substrat p-Nitrophenylphosphat enthält, beschichtet wurde, so dass die chemische Reaktion direkt im Agar stattfinden konnte. Zwar lies sich an den, auf Tesafilm aufgezogenen, Schnitten eine gängige Oberflächenfärbung (0,5% Methylgrün) gut durchführen (Abb. 25), aber das nativ geschnittene Material lies sich schlecht mit dem chromogenen Substrat anfärben, die Reaktion schien hier nur schwach stattzufinden. Die Arbeitsgruppe hat sich deswegen für eine Einbettung der Proben in Methyl-Methacrylat entschieden.

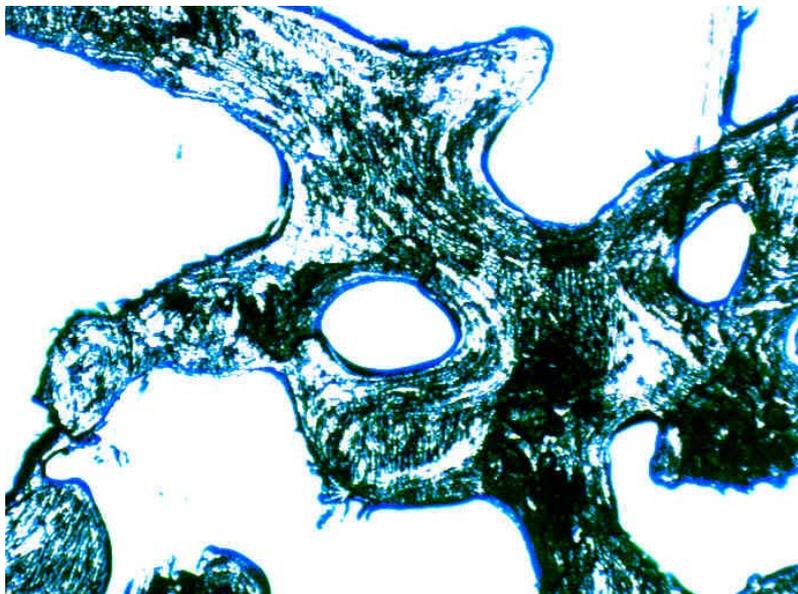


Abbildung 25: Nativer Knochendünnschnitt mit dem Cryotom, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX-Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, Vergrößerung 20fach

3.4. Histochemischer Nachweis der TRAP in GMA-Schnitten

Da man in Glycol-Methacrylat-Schnitten den Kunststoff nicht herauslösen kann, stellt sich auch hier der Nachweis der tartratresistenten, sauren Phosphatase als schwierig dar. Aufgrund des Kunststoffüberzugs kann die chemische Reaktion - die Abspaltung des chromogenen Anteils von p-Nitrophenylphosphats durch die Phosphatase – nun schwer stattfinden. Nur mit Hilfe der Bildbearbeitung lassen sich die roten Spaltprodukte im histologischen Schnitt darstellen. Die Arbeitsgruppe hat sich deswegen gegen diesen Kunststoff entschieden.

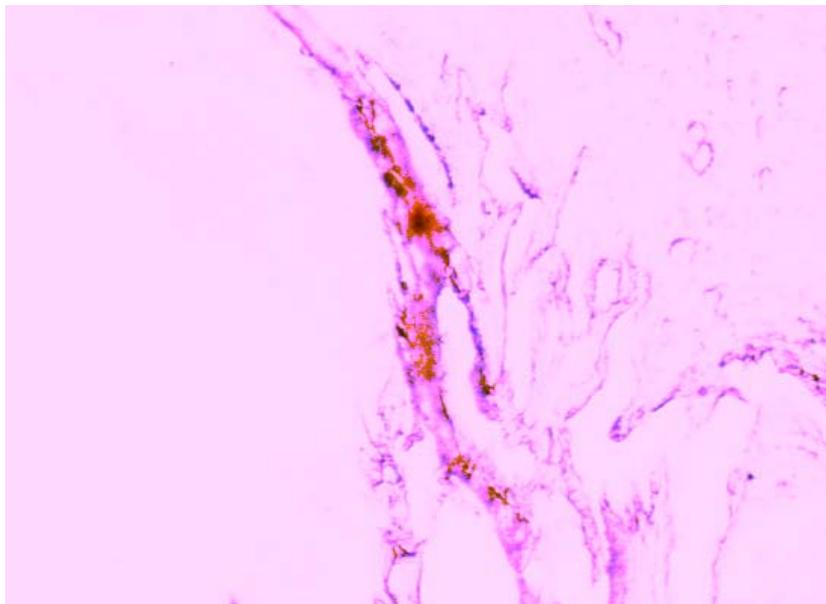


Abbildung 26: Knochendünnschnitt eingebettet in GMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX-Phosphat/Fast Red Violet, bearbeitet mit Bildbearbeitungsprogramm, Vergrößerung 20fach

3.5. Histochemischer Nachweis der TRAP und Pentachromfärbung in MMA- Schnitten

3.5.1. Die TRAP-positiven Lakunen im Knochendünnschnitt

Die besten Ergebnisse wurde in Schnitten erzielt, die unentkalkt in Methylmetacrylat eingebettet und mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF gefärbt wurden. In den Schnitten 27-30 sieht man rote TRAP-positve Lakunen und Zellen.

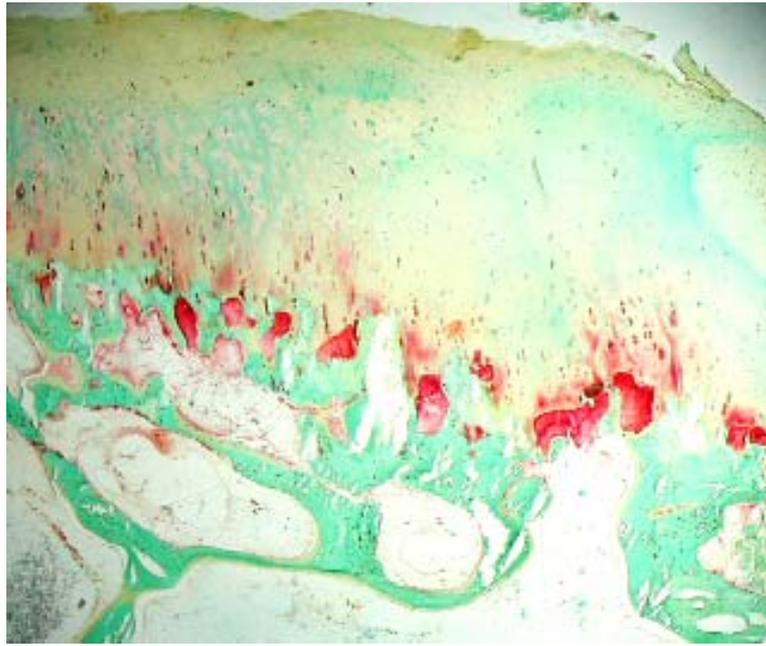


Abbildung 27: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 3/ Zone 1) eingebettet in MMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, TRAP-positive Lakune am Knorpelknochenübergang, Vergrößerung 20fach

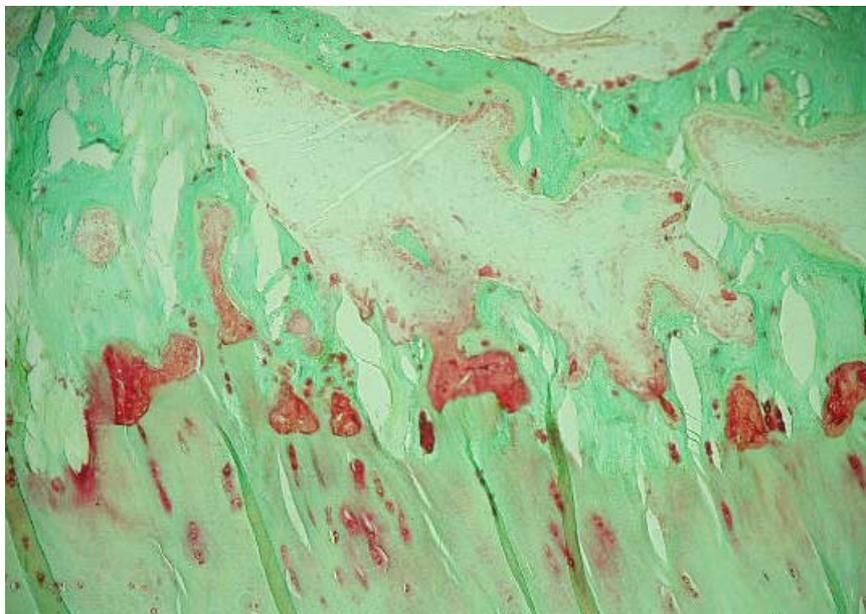


Abbildung 28: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 4/ Zone 1) eingebettet in MMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, TRAP-positive Lakune, Vergrößerung 40fach

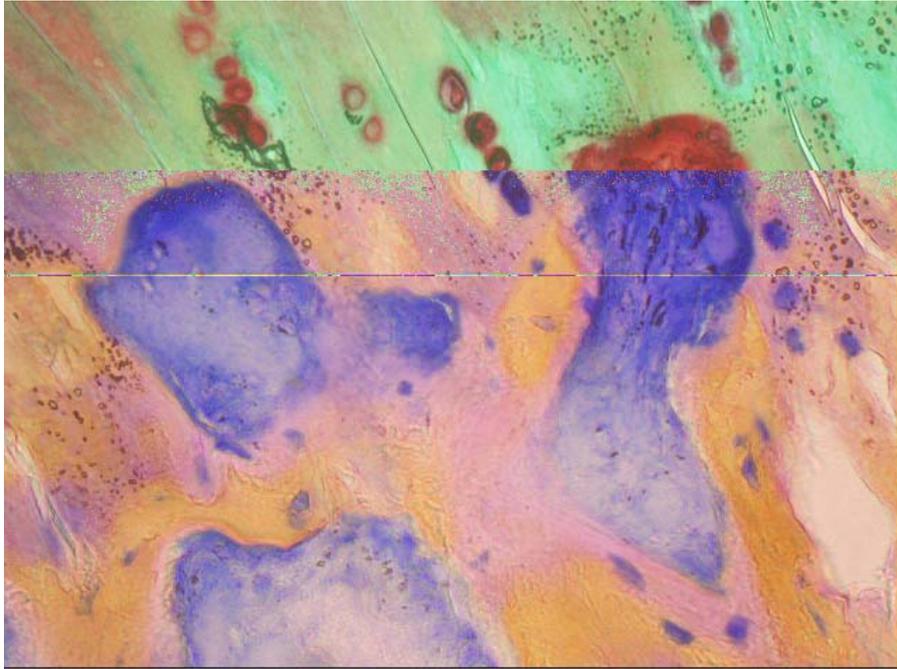


Abbildung 29: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 6/ Zone 1) eingebettet in MMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, TRAP-positive Osteoklasten Vergrößerung 40fach

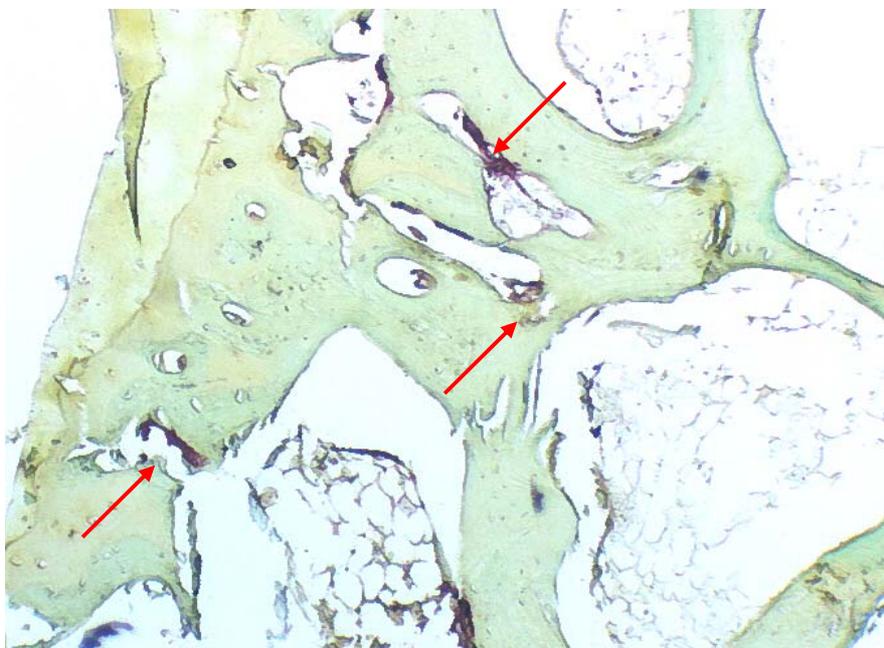


Abbildung 30: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 4/ Zone 1) eingebettet in MMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, TRAP-positive Lakunen in der Knorpelknochenzone (u.a. Pfeile), Vergrößerung 40fach

3.5.2. Dünnschnitt von Kontrollgeweben

Als Kontrollgewebe wurden einerseits mit Hitze behandelter Knochen und Kartoffelgewebe verwendet. Im autoklavierten Knochen zeigt sich keine TRAP 5b Aktivität (Abb. 31), das Protein ist hier schon denaturiert. In der Kartoffel zeigt sich nur in Abwesenheit von L (+)-Tartrat punktuelle Anfärbung der TRAP 5b (Abb. 32), denn im Kartoffelgewebe wird eine tartratsensitive, saure Phosphatase gebildet.

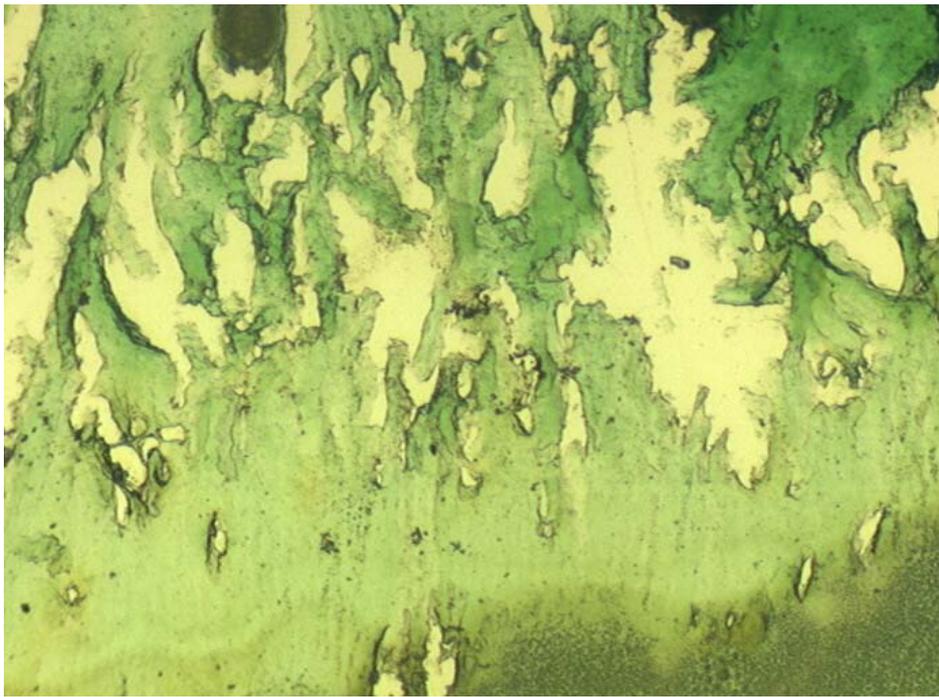


Abbildung 31: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 3/ Zone 1, vgl. Abb. 26), Knochengewebe vorbehandelt im Autoklaven bei 121°C (Zerstörung sämtlicher Enzyme), eingebettet in MMA, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX- Phosphat/Fast Red Violet und Fast Green FCF, keine Anfärbung von Enzym, Vergrößerung 20fach

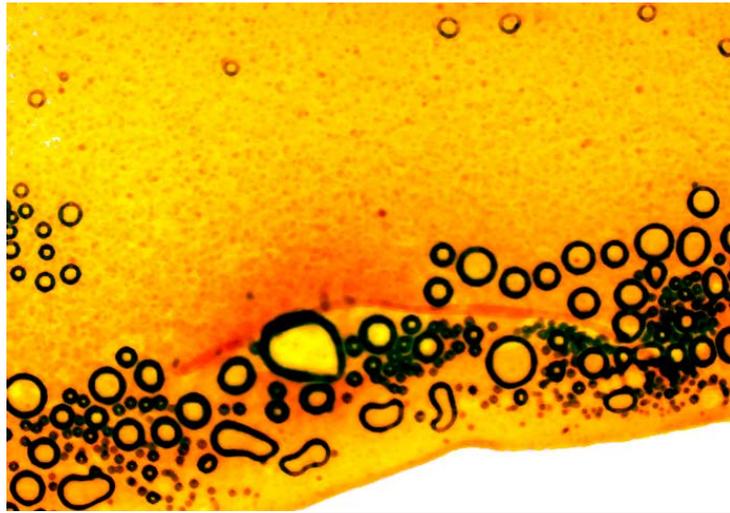


Abbildung 32: Gefrierschnitt einer Speisekartoffel, histochemische Färbung mit Naphtyl-AS-MX-Phosphat/Fast Red Violet, Anfärbung der sauren Phosphatase

3.5.3. Histologischer Nachweis der Knochenvitalität mittels der Pentachrom-Färbung

Die Schnitte werden in der von Movat beschriebenen Pentachromfärbung angefärbt. Das Knorpelgewebe wird grün, der reife Knochen gelb, die Osteozyten blau und das neu gebildete Osteoid rot angefärbt. Als Gruppeneinschlusskriterium muss in allen Proben Bildung von Osteoid in Zone 1 und 2 als Zeichen einer anabolen Stoffwechsellage nachweisbar sein.

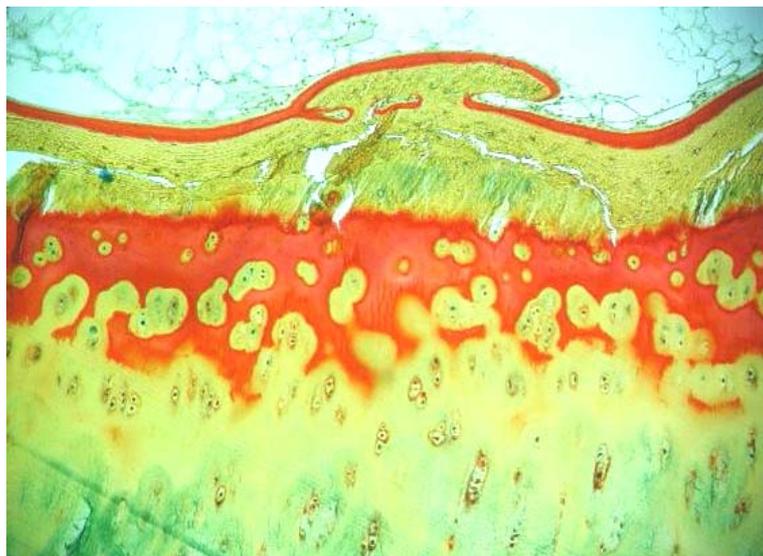


Abbildung 33: Nativer Knochendünnschnitt (Patient A/ Zone 2) eingebettet in MMA, Pentachrom-Färbung nach Movat zur Beurteilung der Knochenneubildung (Osteoid = rote Bereiche), Knorpelknochenübergang mit Knochenneubildung, Vergrößerung 20fach

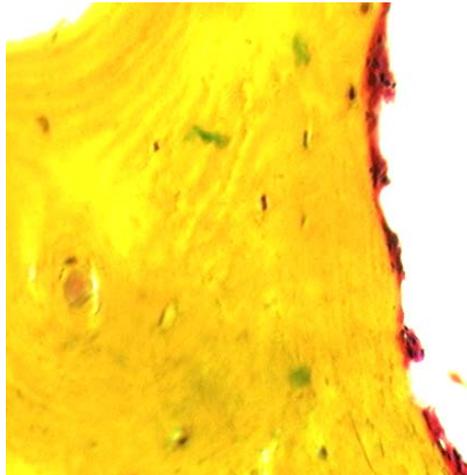


Abbildung 34: Nativer Knochendünnschnitt (Patient 7/ Zone 3) eingebettet in MMA, Pentachrom-Färbung nach Movat zur Beurteilung der Knochenneubildung (Osteoid = rote Bereiche), Osteoblasten mit Osteoidbildung, Vergrößerung 40fach

3.5.4. Ermittlung der durchschnittlichen Anzahl TRAP- positiver Lakunen

Es wurden 6 Patienten der Kontrollgruppe und 4 Patienten der Bisphosphonatgruppe (siehe Anhang) auf die Häufigkeit TRAP-positiver Lakunen untersucht. Anhand der histologischen Schnitte wurde in der Kopfregion, in der Schenkelhalsregion und in der intertrochanteren Zone des Hüftkopfs der Gesamteindruck des Präparats beschrieben und die TRAP-positiven Lakunen, welche sich im Schnitt rot darstellen, unter dem 30iger Objektiv in zehn Sichtfeldern ausgezählt. Hierbei wurde in Zone 1 und 2 immer parallel zur Knorpelknochengrenze gezählt.

Es wurden im Durchschnitt folgende Anzahl positiver Lakunen pro Sichtfeld mit dem 30iger Objektiv in den Gruppen ermittelt:

	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Mittelwert	SDM
Zone 1	2,2	1,1	0,9	1,2	1,3	1,34	0,5029
Zone 2	0,9	1,3	0,8	1,4	1	1,08	0,2588
Zone 3	0,9	1	0,3	0,6	0,6	0,68	0,2774
	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D			
Zone 1	0,3	0,4	0,01	0,2		0,2275	0,1667
Zone 2	0,4	0,7	0,02	0		0,28	0,3350
Zone 3	0,3	0,4	0,3	0,7		0,425	0,1892

Tab. 4: Anzahl der mittleren TRAP- positiven Lakunenzahl/30er Sichtfeld in den MMA-Schnitten

Vergleicht man beide Gruppen, erhält man folgende Tabelle:

	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Prozentualer Unterschied (Kontrolle vs. BP-Gruppe)	83 %	74 %	37%

Tab. 5: Prozentualer Unterschied(Kontrolle vs. BP-Gruppe) der mittleren TRAP- positiven Lakunenzahl/Sichtfeld

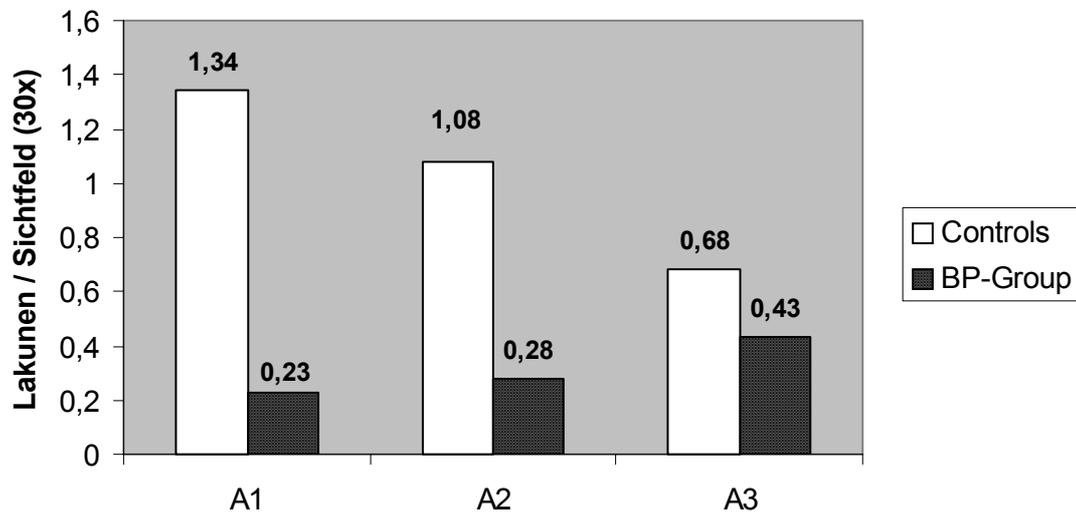


Abbildung 35: Anzahl der ausgezählten TRAP5-positiven Lakunen pro 30er Sichtfeld
Bisphosphonatgruppe vs. Kontrollgruppe

3.6. Nachweis der TRAP in Knochenspänen mittels chemischem Assay

(p-Nitrophenylphosphat-Assay)

3.6.1. Auswertung von n=6 Patienten

Es wurden Knochenproben von 3 Patienten aus der Bisphosphonatgruppe (B, D, E) und von 3 Patienten (4, 5, 6) der Kontrollgruppe mit dieser Methode untersucht (Tab. 6).

Patient	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Anzahl der Stichproben	Bisphosphonat -therapie
	MW +/- STABW	MW +/- STABW	MW +/- STABW		
4	0,01025 +/- 0,00460	0,01125 +/- 0,00301	0,01559 +/- 0,00248	N=3	Nein
5	0,01192 +/- 0,00233	0,01755 +/- 0,00327	0,01578 +/- 0,00578	N=2	Nein
6	0,00813 +/- 0,00147	0,00679 +/- 0,00220	0,00770 +/- 0,00117	N=7	Nein
B	0,01445 +/- 0,00190	0,00909 +/- 0,00071	0,00912 +/- 0,00197	N=10	Alendronat
D	0,01146 +/- 0,00121	0,00690 +/- 0,00071	0,00680 +/- 0,00183	N=10	Risedronat
E	0,00941 +/- 0,00160	0,00885 +/- 0,00141	0,01405 +/- 0,00211	N=10	Alendronat
Mittelwert BP- Gruppe	0,01177 +/- 0,00253	0,00828 +/- 0,00120	0,00999 +/- 0,00370	/	Alendronat
Mittelwert Kontroll- Gruppe	0,01010 +/- 0,00190	0,01186 +/- 0,00541	0,01302 +/- 0,00461	/	Nein

Tab. 6: Aktivität der TRAP 5 in Knochenproben (p-Nitrophenylphosphat-Assay) von 3 Patienten aus der Bisphosphonatgruppe (B,D,E) und von 3 Patienten (4,5,6) der Kontrollgruppe in U/mg Knochen

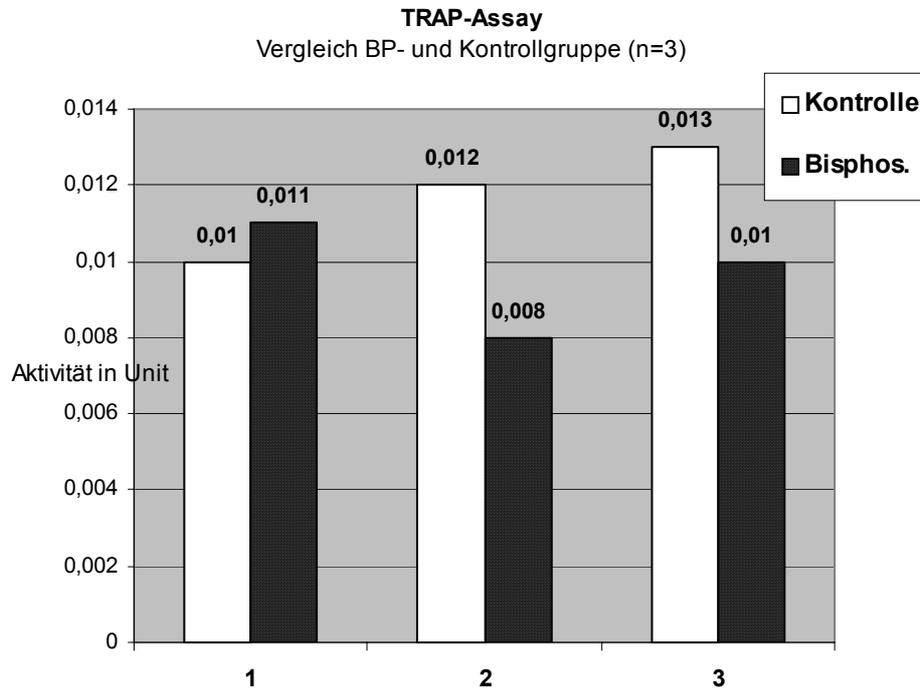


Abbildung 36: Graphische Darstellung aller Ergebnisse des 4-NPP-Assays
Gegenüberstellung der TRAP-Aktivitäten in Unit/mg beider Gruppen

3.6.2. Abhängigkeit der TRAP- Aktivität von der Knochenspangröße

Parallel zu der standardisierten Herstellung der Knochenspäne MIT B (ca. 500 μm Partikelgröße) wurde der Knochenstaub SS B (ca. 100 μm Partikelgröße), der beim Sägen des Knochens entsteht, gesammelt. Vergleicht man die Aktivität der tartratresistenten, sauren Phosphatase in beiden Knochenstanarten desselben Patienten, erhält man folgendes Ergebnis:

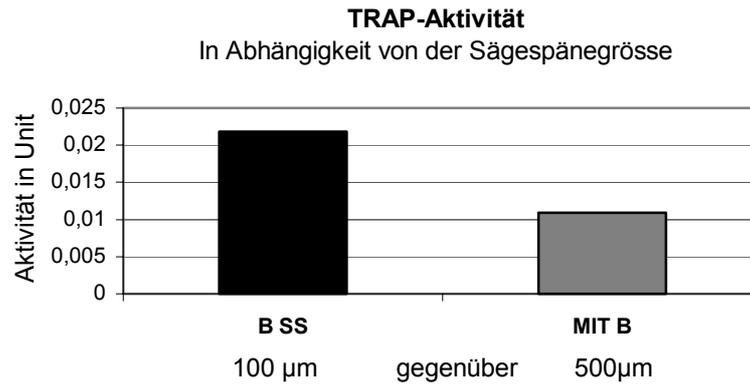


Abbildung 37: Vermessung zweier Proben eines identischen Patienten und identischer Zone, aber mit unterschiedlicher Knochenpartikelgröße: (Patient B/Sägespäne (SS) = 100µm vs. Patient/ mit Mörser hergestellte Späne = 500µm)

Deswegen müssen die Partikel möglichst homogen sein. Betrachtet man die, nach unserer Methode hergestellten, Knochenpäne unter dem Mikroskop, so fallen relative gleichmäßig geformte Knochenpartikel auf, die einen Durchmesser von etwa 500 µm besitzen. Größer geformte Partikel wurden aussortiert.



Abbildung 38: Mikroskopische Übersicht über die Knochenpäne (5fach)

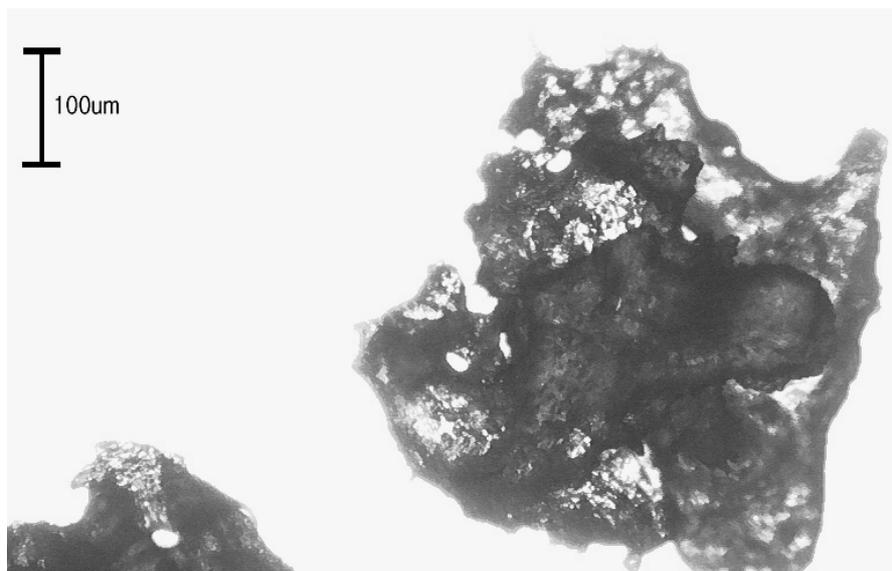


Abbildung 39: Detailaufnahme der Knochenspäne (20fach)

3.7. Nachweis der TRAP 5b in Knochenspänen mittels ELISA- Verfahren

(n=12, Patienten 1-3 konnten aufgrund eines Lagerproblems nicht verwendet werden)

Patient	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Anzahl der Stichproben	Bisphosphonat- therapie
	MW +/- STABW	MW +/- STABW	MW +/- STABW		
4	0,2051 +/- 0,0457	0,1997 +/- 0,0544	0,1113 +/- 0,0484	N=8	Nein
5	0,4275 +/- 0,0589	0,2886 +/- 0,0972	0,5734 +/- 0,2086	N=8	Nein
6	0,2470 +/- 0,1877	0,0725 +/- 0,0171	0,1097 +/- 0,061	N=8	Nein
7	0,0979 +/- 0,0160	0,2156 +/- 0,0284	0,0398 +/- 0,0115	N=8	Nein
8	0,9240 +/- 0,2011	0,3053 +/- 0,0996	0,2983 +/- 0,0706	N=8	Nein
9	0,2524 +/- 0,0682	0,2239 +/- 0,1587	0,1745 +/- 0,0546	N=8	Nein
A	0,4934 +/- 0,1988	0,3169 +/- 0,0381	0,3579 +/- 0,0939	N=8	Alendronat
B	0,5420 +/- 0,1128	0,2731 +/- 0,0672	0,117 +/- 0,0371	N=8	Alendronat
C	0,2563 +/- 0,0711	0,3488 +/- 0,1213	0,2794 +/- 0,0299	N=8	Alendronat
D	0,2066 +/- 0,0718	0,0243 +/- 0,0185	0,0213 +/- 0,0087	N=8	Risedronat
E	0,1803 +/- 0,0598	0,0471 +/- 0,0292	0,0702 +/- 0,0237	N=8	Alendronat
F	0,2269 +/- 0,0912	0,2499 +/- 0,1371	0,2295 +/- 0,1124	N=8	Alendronat
Mittelwert BP- Gruppe	0,3175 +/- 0,1577	0,21 +/- 0,1396	0,179 +/- 0,1306	/	ja
Mittelwert Kontroll-Gruppe	0,3588 +/- 0,2966	0,2176 +/- 0,0825	0,2176 +/- 0,1945	/	Nein

Tab. 7: Aktivität der TRAP 5b in Knochenproben (ELISA) von 3 Patienten aus der Bisphosphonatgruppe (A, B, C, D, E, F) und von 3 Patienten (4, 5, 6, 7, 8, 9) der Kontrollgruppe in U/mg Knochen

Es wurden Proben von zwölf Patienten nach beschriebener Methode bearbeitet, in Bisphosphonat- und Kontrollgruppe eingeteilt und die Proben aus drei Zonen des Knochens entnommen. Anschließend wurde die Enzymaktivität der TRAP 5b in den Knochenspänen mittels eines TRAP 5b Immunoassays ermittelt:

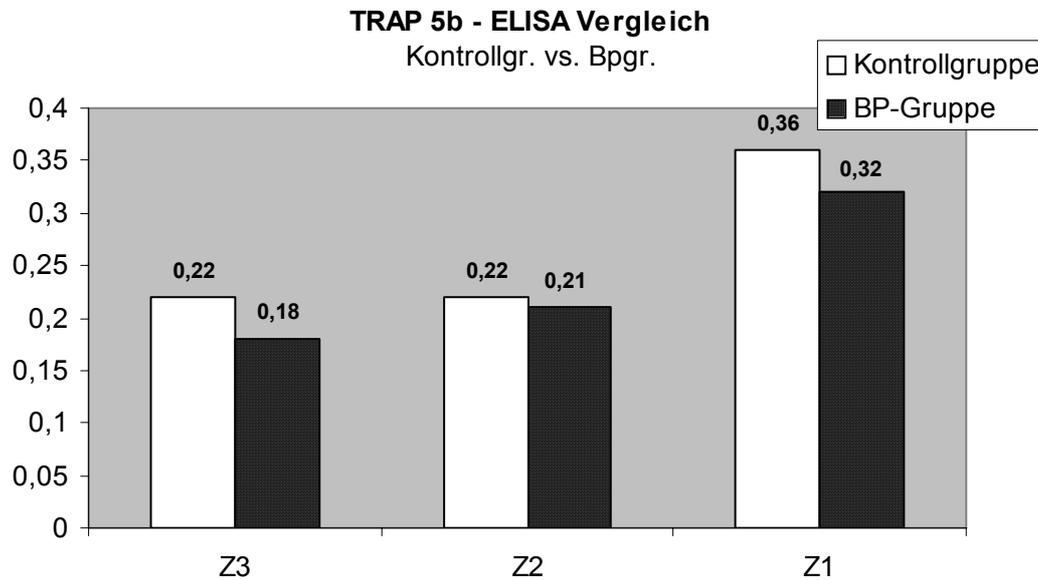


Abbildung 40: Graphische Darstellung aller Ergebnisse des TRAP-ELISA, Gegenüberstellung der TRAP-Aktivitäten in Unit/mg beider Gruppen

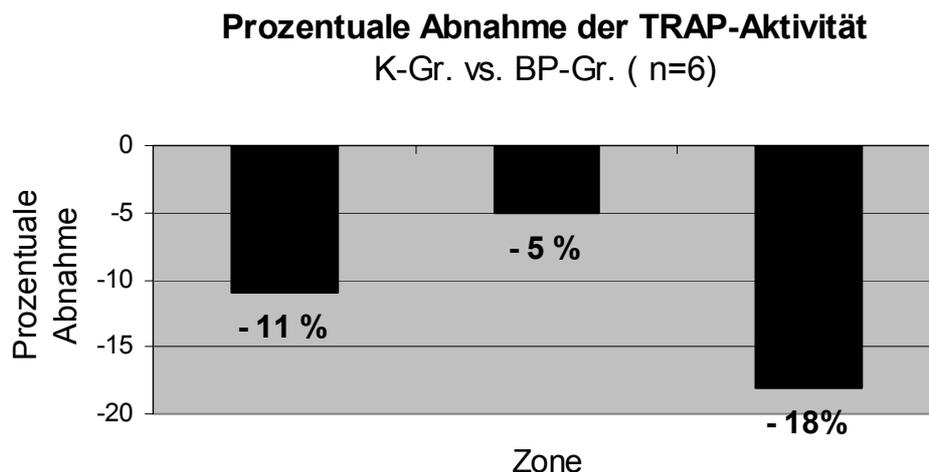


Abbildung 41: Prozentuale Abnahme der TRAP 5b Aktivität in Proben der Bisphosphonatgruppe im Vergleich zum Kontrollkollektiv

3.8. Auswertung der Fragebögen

Es wurden 6 Patienten im Alter von 63 +/- 10,68 (MW +/- Stabw.) jeweils ein Monat nach Beginn der Bisphosphonatherapie mittels eines dafür entworfenen Fragebogen (siehe Anhang) befragt:

Bisphosphonat	Beschwerden bei Einnahme	Korrekte Einnahme	Regelmäßige Einnahme	Dauer der Einnahme	Einnahme von ossär beeinflussenden Medikamenten
Alendronat + 1 Patient Risedronat	0%	90%	90%	1,3 Monate	0%

Tab.8: Auswertung der Fragebögen bei n=6 Patienten

Altersverteilung der Bisphosphonatgruppe

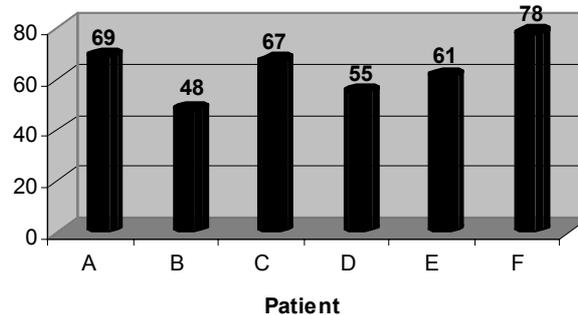


Abbildung 42: Altersverteilung der Bisphosphonatgruppe

Altersverteilung in der Kontrollgruppe (n=6)

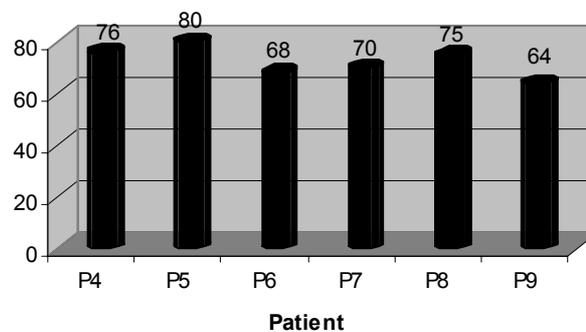


Abbildung 43: Altersverteilung der Kontrollgruppe

**Geschlechterverteilung in der
Bisphosphonatgruppe n=6**



Abbildung 44: Geschlechterverteilung der Bisphosphonatgruppe

**Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe
(n=6)**

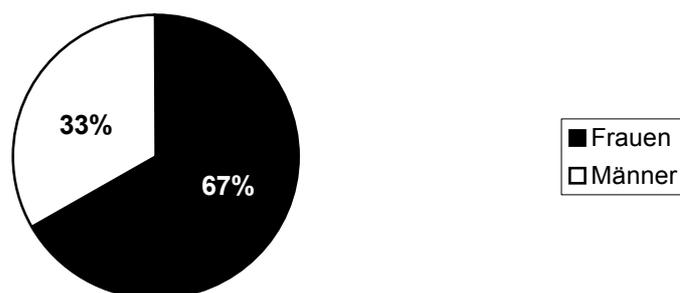


Abbildung 45: Geschlechterverteilung der Kontrollgruppe

4. Diskussion

4.1. Wertung der experimentellen Methoden

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Fragestellung, in welchem Umfang Bisphosphonate im menschlichen Knochen qualitativ sowie quantitativ nachgewiesen werden können. Bisher liegen hierzu keine Untersuchungen vor. Um aber die Grundlage für neue experimentelle Ansätze zur Therapie des pathologisch veränderten Knochenabbaus zu schaffen, sind solche Untersuchungen von großer Bedeutung. King und Usui konnten in tierischem Knochen Pamidronat bzw. YM529 bis zu einer Nachweisgrenze von 7,5 ng bzw. 5ng Bisphosphonat pro mg Knochen bestimmen, nachdem sie den Tieren über ein Jahr Bisphosphonat in hohen Dosen verabreicht hatten [44, 96]. Ein entsprechender Versuch in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Lebensmittelchemie, Garching, Alendronat im humanen Knochen nachzuweisen, brachte kein zufrieden stellendes Ergebnis. Auf Grund der Therapiedauer, die im Schnitt bei 50 Tagen lag, war die vom Knochen aufgenommene Bisphosphonatmenge zwar zu gering, um mittels chromatographischer Nachweisteknik bestimmt zu werden, ausreichend aber, um einen biochemischen Effekt auf die Osteoklasten zu bewirken.

Bei der Extraktion des Bisphosphonat aus dem Knochen und dessen Nachweis wurde eine speziell dafür entwickelte Methode verwendet [44]. Zwar konnte in den Patientenproben kein Alendronat nachgewiesen werden, aber dafür in den Kontrollproben. Diesen wurde eine definierte Menge Bisphosphonat vor Auflösen des Knochens mit Salzsäure beigefügt. Hieraus lässt sich vermuten, dass das Nachweisverfahren korrekt durchgeführt wurde und humaner Knochen bei einer täglichen, oralen Dosis von 10mg Alendronat über 50 Tage weniger als etwa 10ng/mg Knochen speichert.

Um den Effekt des Bisphosphonats auf den Knochen optisch zu erfassen, wurde ein histologisches Modell herangezogen. Auf Grund der in 1.2. beschriebenen Eigenschaften des Bisphosphonatmoleküls ist eine direkte Darstellung im histologischen Schnitt nicht möglich. Zwar besteht die Möglichkeit Clodronat in Lösung mittels des Chelatbildners Thoriumxylenolorange nachzuweisen [100] und in grösseren Mengen auch für das Auge sichtbar zu machen (3.1.), allerdings lässt sich dies nicht auf den histologischen Schnitt übertragen. Die einzige Möglichkeit dafür besteht in der radioaktiven Markierung des Bisphosphonats mittels Tritium [78] und ist somit nur in einem Tiermodell durchzuführen.

Um trotzdem eine Aussage im histologischen Schnitt erzielen zu können, wurde versucht, durch Nachweis von Stoffwechselprodukten des Knochenabbaus einen Rückschluss auf die pharmakologische Wirkung des Bisphosphonats ziehen zu können. Das

Bisphosphonat erzielt seine Wirkung, indem es den Stoffwechsel des Osteoklasten intrazellulär hemmt [75]. Um ein Maß für die Aktivität der Osteoklasten zu erhalten, kommt primär der Nachweis aller Marker des Knochenabbaus (siehe 1.5.) infrage. Doch darunter ist die tartratresistente, saure Phosphatase der einzige Marker, welcher direkt vom Osteoklasten gebildet wird und dessen Stoffwechselstatus am besten wiedergibt. Das Isoenzym V hat weiter den Vorteil, dass es keinen zirkadianen Schwankungen des humanen Stoffwechsels, wie es für die Telopeptide oder andere Marker des Knochenabbaus der Fall ist, unterliegt [29]. Zusätzlich unterscheidet sich die Serumkonzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase nur gering zwischen Männer und Frauen. Erhöhte Werte der tartratresistenten, sauren Phosphatase sind höchst sensitiv für einen gesteigerten Knochenabbau, während Pyridinoline und N-Telopeptide auch beim Abbau anderer Gewebe erhöht sein können [28].

Die tartratresistente, saure Phosphatase kann histologisch mittels des sogenannten Burstone Mediums, einer Mischung aus chromogenen Substrat, das bei enzymatischer Spaltung gelb wird, einem Kopplungsreagenz, welches den gelben Farbstoff in eine roten umwandelt (Diazotierung, Abb. 21) und L(+)-Tartrat, histologisch nachgewiesen werden [16]. Entscheidend ist dabei die Wahl der geeigneten histologischen Einbett- und Schneidetechnik. Ziel muss es sein, den Knochen so nativ wie möglich, also unentkalkt zu schneiden, um keine artifizielle Veränderung des Enzyms zu erhalten. Beim Gefrierschneiden mit dem Kryotom zeigte sich eine geringe Reproduzierbarkeit der Schnitte und die Schnitte selbst liessen sich auf Grund der dafür verwendeten Technik (2.2.4), der Fixierung mit einem Klebestreifen, schwer bis gar nicht anfärben.

Gleiche Resultate zeigten sich auch bei der Einbettung in Glykolmethacrylat, da sich dieses nicht wie Methylmethacryl aus dem Dünnschnitt herauslösen lässt. Es verhindert so die chemische Reaktion des Burstone Mediums. Bessere Ergebnisse lassen sich durch Einbettung des unentkalkten Knochens in ein kaltpolymerisierendes Methyl-Methacrylat erzielen. Da bei dieser Methode, das Gewebe und auch die Enzyme, stärker als beim KälteDünnschnitt beansprucht werden, ist es notwendig Fixierung und Polymerisation immer unter 5°C durchzuführen [12]. Durch weitere Modifikationen bei Fixierung und Entwässerung konnte letztendlich eine schonende Arbeitsvorschrift zum Nachweis der tartratresistenten, sauren Phosphatase im Kunststoffschnitt entwickelte werden. In diesen Schnitten entsprechen dann die roten Anfärbungen der aktiven Form der sauren Phosphatase, denn die aktive Form kann vom chromogenen Substrat p-Nitrophenylphosphat den farbigen Anteil abspalten. Dies lässt sich mittels eines Vergleichsschnitts einer Speisekartoffel – diese enthält eine bestimmte Menge an tartratsensitiver, saurer Phosphatase - beweisen: hier zeigt sich ohne L(+)-Tartrat

derselbe rote Farbton, wie in den Knochenschnitten. Behandelt man dagegen Knochengewebe im Dampfdrucksterilisator bei 120°C werden alle Enzyme denaturiert, in den entsprechenden Schnitten findet man dann keinerlei rötliche Anfärbung.

Diese Anfärbung ist einer gewöhnlichen Oberflächenfärbung, wie z.B. Methylgrün, mit der ja auch Osteoklasten angefärbt werden können, vorzuziehen; solche Oberflächenfärbungen geben keine Auskunft über die Stoffwechselaktivität der Osteoklasten, was aber im Hinblick auf die Bisphosphonattherapie entscheidend ist. In den histologischen Schnitten sind die roten Anfärbungen deutlich zu sehen und ihre bevorzugte Lokalisation z.B. am Knorpelknochenübergang und an den biomechanisch stärker beanspruchten Regionen des Knochens ist in allen Proben zu aufzufinden. Dies stimmt mit anderen Ergebnissen der Literatur überein [71]. Oft lässt sich jedoch kein Zusammenhang der roten Farbprodukte zu einer zellulären Struktur erkennen. Da sich das Enzym entweder intrazellulär im Osteoklasten oder zellständig im Interstitium befindet [2], sollte man einer roten Anfärbung auch Osteoklasten zuordnen können. Doch auf Grund des Auslösens des Kunststoffes aus dem Dünnschnitt wird offensichtlich die Zellstruktur des Osteoklasten geschädigt und es stellt sich nur noch Zelldetritus mit vorhandener enzymatischer Restaktivität - im histologischen Bild rot - dar. Da es aber ohne Auslösen des Kunststoffes nicht möglich ist, die sauren Phosphatasen anzufärben, geht man damit einen Kompromiss ein.

Zählt man die Anzahl der roten Färbeprodukte, den TRAP-positiven Lakunen, in beiden Versuchsgruppen unter dem Mikroskop aus, zeigt sich in der Bisphosphonatgruppe eine deutliche Abnahme der TRAP-positiven Lakunen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der ELISA-Daten (siehe unten), hier sind die entsprechenden Enzymaktivitäten gleich verteilt. Man kann vermuten, dass die TRAP-positiven Zellen positiv zur TRAP 5b- Aktivität korreliert. Somit erhält man durch die semiquantitative Methode des Zellzählens zuverlässige und mit anderen Messungen vereinbare Ergebnisse. Reimann und Kollegen untersuchten 24 arthrotische Hüftköpfe histologisch und färbten die saure und alkalische Phosphatase an. Es zeigten sich grössere Schwankungen und kein spezielles Enzymverteilungsmuster war zu erkennen. Allerdings wurden die grösste Anzahl TRAP-positiver Zellen im subchondralen Knochen – entsprechend Zone 1 - entdeckt. Laut den Autoren lässt sich aber mittels ihrer Methoden der Grad der Regeneration bzw. Resorption des jeweiligen Knochenareals erkennen [71].

Zur Beurteilung der TRAP 5b-Aktivität im Knochen, können die Arbeiten von Pedrazzoni und Martinez, in denen die Konzentrationen der tartratresistenten, sauren Phosphatase im Serum mittels p-Nitrophenylphosphat-Assay bestimmt wurden, als Vergleich herangezogen

werden [56, 67]. Beide Arbeitsgruppen ermittelten eine leichte Aktivitätsabnahme der tartratresistenten, sauren Phosphatase unter Bisphosphonattherapie. In beiden Studien wurde das Bisphosphonat über einen Zeitraum von fünf bzw. zwei Tage eingenommen, die Aktivität im Serum und nicht im Knochen bestimmt und die Analyse der Enzymaktivität mittels p-Nitrophenylphosphat/L(+)- Tartrat-Assay durchgeführt. Diese Nachweismethode muss kritisch betrachtet werden, da zum einen die tartratresistente, saure Phosphatase auch in Erythrozyten und Thrombozyten gebildet wird und zum anderen nach eigenen Erfahrungen die tartratsensitiven Phosphatasen trotz Hemmung mit L(+)- Tartrat eine Restaktivität besitzen. Zusätzlich werden die photometrischen Eigenschaften des p-Nitrophenylphosphat durch Hämoglobin verändert bzw. gestört und verfälschen besonders in blutreichen Proben das Ergebnis. Deswegen kann diese Methode nicht zur exakten Analyse der TRAP 5b im Knochengewebe verwendet werden.

Es ist sinnvoll, zur Untersuchung der TRAP- Aktivität das Enzym direkt in Knochenspänen zu messen, dabei Proben von Patienten zu nehmen, die mindestens ein Monat mit Bisphosphonaten therapiert wurden und die Messungen mittels einer immunologischen Methode durchzuführen. J. Hallen und Kollegen entwickelten 1998 einen Antikörper für das Isoenzym 5b der sauren Phosphatase [25]. Dieses Produkt ist speziell zur Enzymbestimmung in Serumproben entwickelt worden und weist nur die aktive Form der tartratresistenten, sauren Phosphatase 5b nach. Da nur die Osteoklasten diese aktive Form produzieren, die anderen genannten Zellen, wie z.B. Makrophagen, nur die inaktive Form bzw. Isoenzym 5a bilden, ist der Test als Maß der Aktivität der Osteoklasten höchst spezifisch [27]. Unser Ziel war es nun, eine Versuchsvorschrift zu entwickeln, die den Nachweis in Knochenspänen anstatt im Serum erlaubt. Hierbei wurden gleichmässig grosse Knochenspäne durch eine reproduzierbare Methode hergestellt; denn wie unsere Ergebnisse zeigen, ist diese Herstellung von Partikeln gleicher Größe sehr wichtig, da die Enzymaktivität abhängig von der Spangröße ist (siehe oben). Anschliessend wurden die Proben zu Portionen von 20mg bis 30mg abgewogen und eine Woche mit Kochsalzlösung inkubiert. Dieser Überstand diente dann als Analysat. Da es sich um eine neu entwickelte Methode handelt, liegen für die Aktivitäten keine Normwerte vor, es kann aber vermutlich von ähnlichen Verhältnissen wie im Serum ausgegangen werden.

In unseren Auswertungen zeigt sich unter einmonatiger Bisphosphonatherapie eine Aktivitätsabnahme der tartratresistenten, sauren Phosphatase 5b in allen drei Zonen. Den höchsten Abfall von etwa 18% wurde in Zone drei, der intertrochanteren Zone, ermittelt, in der Kopfzone 1 liegt dieser bei 11% und in der Zone 2 des Schenkelhalses bei 5%. Dies lässt

sich vermutlich durch den größeren Effekt des Bisphosphonats in der intertrochanteren Zone erklären. Der Bereich ist am weitesten vom Gelenk entfernt und ist geringer vom Stadium der Arthrose beeinflusst. Der Knochen ist am besten durchblutet und hat hier eine grössere Knochenumbaurate. Die Abnahme der Enzymaktivität im Knochen scheint im Einklang mit den Ergebnissen in Serumproben zu stehen, denn es zeigt sich unter Alendronattherapie auch im Serum einen Aktivitätsabfall der TRAP von 16%-21% [67].

Um nun dieses immunologische Nachweisverfahren zu beurteilen, wurde an sechs Patienten auch die Enzymbestimmung durch das herkömmliche Verfahren mit dem chromogenen Substrat 4-Nitrophenylphosphat durchgeführt. Da sich die absoluten Werte des ELISA und des enzymatisch- chemischen Assays um eine Zehnerpotenz unterscheiden, kann darüber nur eine relative Aussage getroffen werden. So zeigt sich mit beiden Verfahren ein vergleichbarer Abfall der Enzymaktivität unter Bisphosphonattherapie in Zone 1 und Zone 2. In Zone 3 dagegen sind dem 4-NPP-Assay zufolge die Enzymaktivitäten beider Gruppen fast gleich, mittels ELISA ermittelt man hier den höchsten Abfall. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der 4-NPP-Assay durch hohe Anteile von Erythrozyten, die in Zone 3 vermehrt auftreten, gestört wird. Zum einen bilden diese Zellen auch saure Phosphatasen, zum anderen verfälscht freigesetztes Hämoglobin die chromogenen Eigenschaften des 4-Nitrophenylphosphats. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Konzentration der tartratresistenten, sauren Phosphatase in den beiden Versuchsgruppen vom Stadium der Arthrose beeinflusst ist und somit nicht den Werten eines Normpatienten entspricht. Durch die starke Wirkung der Bisphosphonate auf den Knochen lässt sich trotz der Gruppeninhomogenität und der begrenzten Patientenzahlen ein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (in A3 KG gegenüber BPG signifikant unterschiedlich; $p < 0.05$) im Sinne eines Trends erkennen, der im wissenschaftlichen Kontext sinnvoll ist.

Betrachtet man das Patientenkollektiv, so lässt sich eine ausreichende Homogenität der beiden Gruppen durch folgende Parameter erzielen: das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe bzw. Versuchsgruppe betrug 70,4 +/- 7,1 (MW +/- Stabw.) bzw. 63 +/- 10,68 (MW +/- Stabw.). Auf Grund des vorgerückten Alters der Patienten ist auch die Verteilung der Geschlechter wichtig, besonders wegen der bei Frauen postmenopausal erhöhten Werte der tartratresistenten, sauren Phosphatase 5b [28]. So ergab sich in beiden Gruppen eine Verteilung von 67% Frauen zu 33% Männern. Auch wurde bei keinem Patienten in der Medikamentenanamnese die Einnahme von den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Substanzen erfasst. So kann von einem relativ homogenen Patientenkollektiv ausgegangen

werden. Zusätzlich konnten an jeder Patientenprobe mikroskopisch wie makroskopisch die Zeichen einer Gelenksarthrose festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Fragebogen ausgearbeitet, der den Patienten der Bisphosphonatgruppe zum Beantworten ausgehändigt wurde. Dies sollte sicherstellen, dass die Patienten das Medikament vorschriftsmäßig eingenommen hatten, da oft Schwierigkeiten mit der zuverlässigen Einnahme in der Literatur beschrieben werden. So müssen die Tabletten Fosamax (Alendronat) nach dem morgendlichen Aufstehen eine halbe Stunde vor dem Frühstück eingenommen werden. Zwischen Aufstehen und Frühstück soll sich der Patient nicht mehr in eine waagrechte Position begeben. Diese strengen Einnahmевorschriften sind durch mehrere Dinge erklärbar. Auf Grund der geringen oralen Bioverfügbarkeit von Alendronat von 0,5-1% [21] muss die gleichzeitige Einnahme von Bisphosphonat mit kalziumreicher Nahrung sowie Orangensaft, Kaffee und Milch vermieden werden. Außerdem sollte man nach Einnahme des Bisphosphonats wegen den häufig angegebenen Reflux- und Magenbeschwerden [7] in senkrechter Position verbleiben. In unserer Versuchsgruppe klagte kein Patient über Einnahmeschwierigkeiten oder Nebenwirkungen. Ansonsten wurden keine anderen Medikamente eingenommen, welche die intestinale Resorption des Bisphosphonats stören oder den Knochenstoffwechsel in irgendeiner Weise beeinflussen hätten können.

4.2. Bisphosphonate und Bedeutung der erhobenen Befunde für die Klinik

Es gilt nun zu klären, in wieweit die Ergebnisse Grundlage für weitere Untersuchungen bieten. Es stellt sich die Frage, ob sich Bisphosphonate zur Verhinderung der aseptischen Lockerung von Endoprothesen einsetzen lassen. Denn durch Wanderung von Polyethylen-Partikel in das Prothesen-Knocheninterface kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion und einer Freisetzung von Interleukinen, wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6, die zu einer Aktivierung der knochenresorbierenden Osteoklasten führen [34]. Da die Bisphosphonate eine inflammatorische Wirkung und eine hohe Knochenaffinität besitzen, liegt ein Therapieversuch nahe. Um diesen Effekt zu studieren, bietet sich die Zellkultur an; denn bei der Reaktion am Protheseninterface sind von den vier entscheidenden Mechanismen - Aktivierung, längeres Überleben, schnellere Differenzierung und stärkere Rekrutierung von Osteoklasten - die beiden Letzteren für die partikelinduzierte Lockerung am wichtigsten [22]. Zur Untersuchung dieser molekularen Vorgänge am Protheseninterface ist so ein Differenzierungsmodell zu reifen Osteoklasten anzustreben: Eine Mischkultur aus hämatopoetischen Stammzellen, den Prekursorzellen der Osteoklasten und aus Osteoblasten in Gegenwart oder Abwesenheit von Abriebpartikel. Nach Kontakt der Zellen mit den Abriebpartikeln werden die im Körper

ablaufenden Mechanismen simuliert. Dies betrifft den Zell-Zell-Kontakt bzw. die Interaktion der Integrine und die hierbei ausgelösten Reaktionen. Besonders von Interesse ist die Rekrutierung und Differenzierung der Osteoklasten aus Stammzellen, die nur in Anwesenheit von Osteoblasten bzw. sRANKL oder TNF- α und M-CSF stattfinden kann und u.a. durch Abriebpartikel induziert wird. Für die partikelinduzierte Osteolyse des Protheseninterface sind so die Konzentrationen von M-CSF, sRANKL, TGF- β , TNF- α , Il-1, Il-6 und Osteoprotegrin von Interesse und sind in diesem Zusammenhang in An- und Abwesenheit von Bisphosphonaten zu messen. Neben der Rekrutierung der Osteoklasten sollte auch die vermehrte Aktivität der Osteoklasten in Anwesenheit von Abriebpartikel studiert werden. Hierbei kann die Aktivität der tartratresistenten, sauren Phosphatase mittels der in dieser Arbeit beschriebenen immunologischen Methode bestimmt werden. Anschliessend misst man diese in Abhängigkeit von der applizierten Menge an Bisphosphonat. Zusätzlich lassen sich andere Produkte der Osteoklasten wie die Carbonanhydrase II, Metalloproteinasen und Kathepsine nachweisen. Diese bestätigen die kultivierten Zellen dann als reife Osteoklasten und geben Hinweise über die Aktivität der Osteoklasten .

Sabokbar und Mitarbeiter versuchten 1998 die Stimulation von Osteoklasten nach Kontakt mit Polymethylmetacrylat als Bestandteil von Knochenzement, welchem eine hohe Menge an Etidronat beigemischt wurde, zu verhindern. Als Modell wurde eine Zellkultur gewählt, die aus Mäusemonozyten und „UMR106-osteoblast-like cells“ der Ratte bestand. Hierzu wurde dann das Etidronat-Knochenzement-Gemisch gegeben und eine verringerte Aktivität der Osteoklasten beobachtet [76]. Anstatt die Bisphosphonate über den Knochenzement in das Protheseninterface lokal einzubringen, bestünde auch die Möglichkeit, Prothesen vor der Implantation mit einem hochpotenten Bisphosphonat wie z.B. Zoledronat zu beschichten, wobei eine Polylaktidschicht als Trägermedium dienen könnte. Diese in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Schicht hätte zusätzlich zu den Effekten des Bisphosphonats eine antibiotische Wirkung. In Vorversuchen müsste festgestellt werden, ob das Bisphosphonat kontinuierlich, in welchen Mengen und über welchen Zeitraum aus dem Polylaktid freigesetzt würde.

Neben diesen lokalen Anwendungen der Bisphosphonate steht zur Diskussion, ob die systemische Gabe von Bisphosphonaten nach Implantation die Standzeit der Prothese verlängert. Wilkinson untersuchte 2001 in einer Doppelblindstudie an 47 Patienten den Einfluss einer einmaligen Gabe von 90 mg Pamidronat nach Einbau einer totalen Hüftendoprothese. Bei der anschliessenden 26-wöchigen Untersuchung wurde festgestellt, dass die einmalige Gabe von Pamidronat einen Anstieg der Marker der Knochenumbaus im

Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verhindert. Eine Ausnahme machten hierbei allerdings die Desoxypyridinoline [103]. Ebenso konnten Venesmaa und Kollegen zeigen, dass Patienten nach Implantation einer unzementierten Hüftprothese unter sechsmonatiger Alendronat- (10mg/d)/ Calciumtherapie (500mg/d) einen geringeren Verlust der periprothetischen Knochendichte ($\Delta\text{BMD} = 0,9\%$) als die Kontrollgruppe ($\Delta\text{BMD}=17,1\%$) erlitten [97]. Probleme bereitet sicherlich noch die Festlegung auf den geeigneten Therapieplan. Besonders die Frequenz der Bisphosphonatgabe für diesen speziellen Einsatz muss noch gründlich untersucht werden, zumal eine wöchentliche oder monatliche Bolusgabe genauso wirksam zu sein scheint wie die tägliche Verabreichung. Gezielt muss die richtige Dosis in Studien erfasst werden, da sich in den genannten Studien erst eine Dosis von 10 bis 20mg Alendronat pro Tag auf das Einwachsverhalten der Prothese auswirkt [33]. In diesem Zusammenhang versprechen auch die neuen, hochpotenten Bisphosphonate wie Zoledronat bessere Ergebnisse. Mit diesen neuen Bisphosphonaten müssen in Langzeitstudien die genaue Dosis und Einnahmefrequenz gefunden werden, um die bestmögliche Standzeit einer Endoprothese zu erlangen.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Schneider [82], der mittels erhöhten Desoxypyridinolin, Pyridinoline und aminoterminalen Telopeptiden im Serum von Prothesenträger eine frühzeitige Lockerung der Prothese nachweisen konnte, lässt diese Studie von Wilkinson und Mitarbeitern neue Ansätze zur Verhinderung eines Prothesenwechsels erwarten. Durch frühzeitige Diagnose der bevorstehenden Lockerung könnte nun mit einer Bisphosphonatherapie der Versuch gestartet werden, den Prothesenwechsel herauszuzögern. Besonders könnte die Verwendung von neueren und potenteren Bisphosphonaten wie Zoledronat und Risedronat, die einen deutlich höheren Effekt auf die Knochenresorption haben, Bedeutung erlangen.

Auf der Suche nach neuen Therapieansätzen in der Osteoarthrosebehandlung kann auch ein Bisphosphonat als mögliches Therapeutikum in Erwägung gezogen werden. Im osteoarthrotischen Knochen wird ein abnormaler Stoffwechsel der subchondralen Knochenplatte beobachtet. Dieser Knochenbereich sklerosiert und versteift. Dadurch ist der darüberliegende Knorpel erhöhten Scherkräften ausgesetzt und wird leichter zerstört. Es kommt zum Abbau des gelenknahen Knochens mit der Ausbildung einer osteopenischen Knochenstruktur. Es finden sich Geröllzysten mit fibrösem, knorpeligem oder myxoidem Gewebe und Osteophyten an gelenkspezifischen Stellen [10]. Oft sind diese Veränderungen des Knochens in der Knochenszintigraphie durch erhöhte Anreicherung vor einem radiologischen Befund zu erkennen. Auch in magnetresonanztomographischen

Untersuchungen zeigen sich frühe Befunde wie Hyperämie, Osteopenie und Mikrofrakturen im gelenknahen Knochen [39, 40]. Es konnte nachgewiesen werden, dass subchondrale Knochenplatte und Knorpel über dendritische Kanäle miteinander kommunizieren [60]. So gelangen Entzündungsmediatoren vom Knochen in den Knorpel und umgekehrt. Manche Autoren sehen die Knochenplatte und den darüberliegenden Knorpel deswegen als funktionelle Einheit [60]. Diese Veränderungen des Knochens können möglicherweise mittels Gabe von Bisphosphonaten positiv beeinflusst werden. Eine Verminderung des abnormalen Stoffwechsels der subchondralen Knochenplatte bei Osteoarthritis kann vermutet werden. So zeigten Fujita und Mitarbeiter, dass die Gabe von Etidronat zu einer Abnahme der Schmerzsymptomatik und zu einer Zunahme der Knochendichte bei Patienten mit Osteoarthritis unterschiedlicher Gelenke kommt [19]. Da aber die Wirkung von Bisphosphonaten stark von der Durchblutung und Stoffwechselaktivität des Knochens abhängt, stellt sich die Frage, in wieweit sich Bisphosphonate in arthrotisch verändertem Knochen einlagern und dort wirken, und ob die oben beschriebene Wirkung der Bisphosphonate bei Arthritis von einem lokalen Effekt hervorgerufen wird. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich möglicherweise ein anti-resorptiver Effekt der Bisphosphonate auf den arthrotischen Knochen; es muss nun sichergestellt werden, ob dieser Effekt das weitere Fortschreiten der Arthritis wirklich positiv beeinflusst.

Neben dieser Wirkung der Bisphosphonate auf den Knochenabbau sollten auch Substanzen mit anaboler Wirkung auf den Knochenstoffwechsel nicht vergessen werden. Neuesten Forschungen zufolge sollen die seit langem in der Therapie der Hyperlipidämie eingesetzten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer einen den Bisphosphonaten ähnlichen Effekt besitzen, da auch sie im Mevalonatstoffwechsel angreifen und somit ein gewisser Synergismus vermutet werden kann. Andererseits sollen die Statine Simvastatin und Compactin, nicht aber Pravastatin, die Bildung von BMP-2 und BMP-4 fördern, was zu einer gesteigerten Osteoblastogenese führt [54, 64, 87]. Die Statine haben eine Promotorfunktion auf die genetische Expression der „bone morphogenetic proteins“. Als grundlegendes Prinzip der BMP-Induktion wird zurzeit eine hemmende Wirkung der Statine auf die endotheliale Stickstoffoxidsynthase (eNOS) der Osteoblasten diskutiert, was die Induktion eines BMP-2-Promotors zur Folge hat. So zeigt eine retrospektive Fallkontrollstudie, dass die Einnahme von Statinen über 180 Tage das Auftreten einer Schenkelhalsfraktur um etwa 50% senkt [101]. Reid und Mitarbeiter fanden dagegen in einer Doppelblindstudie heraus, dass die tägliche Gabe von 40mg Pravastatin keinen Vorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe bringt; angemerkt sei aber, dass Pravastatin, wie sich später herausstellte, keinen stimulatorischen

Effekt auf die BMP-Expression in Zellkultur hat [87]. Als Nachteil der Therapie mit Statinen erweist sich allerdings deren geringe Affinität zum Knochen, man erreicht dort bei einer oralen oder intravenösen Gabe nur sehr geringe Konzentrationen. Deswegen muss nach Möglichkeiten gesucht werden, die Statine lokal mittels Trägermedien zu applizieren oder deren Knochenaffinität pharmakologisch zu steigern.

Das Bisphosphonatmolekül dagegen hat eine so grosse Affinität zum Knochen, dass sich die Frage stellt, ob die eingebauten Moleküle dem Knochen die gleichen biomechanischen Eigenschaften verleihen wie das körpereigene Kalziumphosphat, und wie lange das Bisphosphonat eingelagert bleibt. Da die ersten Bisphosphonate zum Schutz vor Verkalkung benutzt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass diese den physiologischen Knochenumbau stören könnten. Doch Wang und Kollegen zeigten 1999, dass trotz der dauerhaften Einlagerung der Bisphosphonate in den Knochen dieser seine physiologischen Eigenschaften und Stabilität nicht verliert. In einem Rattenmodell wurden den Tieren 23 Wochen täglich eine bestimmte Menge Alendronat per os gegeben und nach dieser Zeit die Rattenfemora auf Frakturanfälligkeit, Elastizitätsmodul, Zugfestigkeit, Härte, Porosität und Gewichtsanteil der organischen und anorganischen Matrix geprüft. Ebenso wurde die Mikrostruktur des Knochens mikroskopisch untersucht und keine Veränderungen gefunden [102]. Auch Mashiba und Kollegen zeigten, dass Knochen von Hunden nach hohen Dosen und längerer Therapiedauer zwar Mikrofrakturen aufweisen, aber in biomechanischen Testverfahren signifikant härter sind als Knochen der Kontrollgruppe [57].

King et al. untersuchten den Abfall der Bisphosphonatkonzentration nach einem Jahr Therapiepause in Knochen von Hunden, die ein Jahr mit einer hohen Dosis Pamidronat behandelt wurden, (siehe auch 1.1.). Hierbei zeigte sich, dass die eingelagerte Menge Bisphosphonat in einem Jahr bis zu 45% abnimmt: Je höher man die Therapiedosis wählte, desto geringer war die prozentuale Abnahme der Pamidronatkonzentration. Bisphosphonate scheinen ihre Verweildauer im Knochen selbst zu regulieren.

Da Bisphosphonate hauptsächlich über den Urin ausgeschieden werden [20], kann man anlehnend an dieses Tiermodell versuchen, die ausgeschiedene Menge an Bisphosphonat im Urin nachzuweisen. Diese Bestimmung mittels HPLC- Technik ist zum einen einfacher durchzuführen und es können noch geringere Konzentrationen als im Knochen nachgewiesen werden [86]. Usui et al. konnten das Bisphosphonat YM 175 bis zu einer Nachweisgrenze von 1ng/ml Urin und 25ng/g Knochen bestimmen [95]. Weiter wären dann in diesem Versuchsaufbau die biomechanischen Eigenschaften des Knochens direkt nach der Therapie

und ein Jahr später mittels geeigneter biomechanischer Tests zu bestimmen und zu vergleichen.

Da die pharmazeutische Industrie immer potentere Bisphosphonate wie z.B. Zoledronat, welches eine 100fach stärkere Wirkung als Alendronat zeigt, entwickelt, steht in Zukunft die Therapie verschiedener Knochenerkrankungen durch die wöchentliche oder monatliche Gabe eines hochpotenten Bisphosphonat zur Diskussion. Wie schon angedeutet, besitzen die Bisphosphonate auf Grund ihrer hohen Knochenaffinität einen Art Depoteffekt, der ihre Wirkung noch lange nach einmaliger Gabe beibehält. Auch hierbei eignen sich die in dieser Arbeit entwickelten Methoden, um neue Therapieschemata zu entwickeln und evaluieren.

5. Zusammenfassung

Neuere Arbeiten belegen für Bisphosphonate einen positiven Effekt bei Osteoarthrose und Hüftimplantaten zur Verhinderung aseptischer Lockerung bzw. periprothetischen Knochenschwund [31,98]. Literatur zum direkten Nachweis dieser Pharmaka im Knochen sind spärlich vorhanden. Der Nachweis knochenständiger Bisphosphonate ist notwendig, um die positiven Eigenschaften dieser Stoffgruppe besser zu verstehen. Die Zielvorstellung der vorgelegten Arbeit ist der Wirknachweis von Bisphosphonaten im Knochen, sowie der Einfluss zellulärer Mechanismen auf die Osteoklasten.

Für diese Studie wurden im Zeitraum März 2001 bis September 2002 die Hüftköpfe von 12 Patienten untersucht. Die Patienten der Bisphosphonatgruppe wurden präoperativ über einen Zeitraum von ungefähr 50 Tagen mit Alendronat oder Risedronat behandelt und unterzogen sich dann dem operativen Einbau einer Hüftendoprothese. Die Patienten der Kontrollgruppe nahmen keinerlei den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Medikamente ein. Die bei der OP anfallenden Hüftköpfe wurden neben der allgemeinen histologischen Untersuchung mittels speziell in dieser Arbeit entwickelten, chromatographischen und einer neu entwickelten histologischen Technik untersucht. Die direkte Isolierung der Bisphosphonate konnte mit einem aufwendigem Verfahren durchgeführt werden, auf Grund der Molekülstruktur war es jedoch nicht möglich mittels HPLC-Verfahren, Derivatisierung und nachfolgender Massenspektrometrie die applizierten Bisphosphonate zu bestimmen. Es wurde daher der indirekte Weg eingeschlagen, die Phosphataseaktivität der Osteoklasten in Abhängigkeit der gewebeständigen Pharmaka Alendronat bzw. Risedronat nachzuweisen. Hierzu wurde ein neues Verfahren entwickelt, um die Phosphataseaktivität (tartratresistente, saure Phosphatase 5, TRAP 5) mit einem chromogenen Substrat im Gewebeschnitt direkt nachzuweisen bzw. die Enzymaktivität quantitativ im Reagenzglas zu bestimmen. Weiter ist es gelungen einen monospezifischen Antikörper, der zur Aktivitätsbestimmung der Phosphatasen (TRAP 5b) im Serum geeignet ist, für einen speziell für Knochenproben entwickelten, immunchemischen Test der knochenständigen Phosphataseaktivität einzusetzen. Die mit diesen Verfahren durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es unter Bisphosphonatherapie zu einem Aktivitätsverlust der TRAP 5b um 18% in Zone 3 (intertrochantere Zone), 5% in Zone 2 (Schenkelhals) und 11% in Zone 1 (Kopfbereich) im Vergleich zum Kontrollkollektiv kommt. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit klassischer histologischer Untersuchungstechnik, wie das Auszählen der TRAP-positiven Zellen, erhoben werden.

Durch die Etablierung dieser neuen Testverfahren ist der Nachweis gelungen, dass Bisphosphonate auch in Bereichen großer degenerativer Schäden und Beanspruchung des Knochens eine Abnahme der TRAP 5b- und somit Osteoklastenaktivität bewirken. Diese Daten erlauben somit die Schlussfolgerung, dass auf Grund von Durchblutung und des Knochenstoffwechsels die Bisphosphonatmoleküle in diese Bereiche des Knochens abgelagert werden. Die Vorstellung der neuen Testverfahren stellt somit den Einsatz von Bisphosphonaten zur Behandlung von Osteoarthrosen, zur Verzögerung des Lockerungsprozesses und zur Verbesserung der Osteointegration von Endoprothesen in einem neuem Licht dar.

6. Literaturverzeichnis

1. Akatsu, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Imamura, K., Yamaguchi, A., Sato, K., Nagata, N., Suda, T. Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J Bone Miner Res* 6 (1991) 183-189
2. Alatalo, S. L., Halleen, J. M., Hentunen, T. A., Monkkonen, J., Vaananen, H. K. Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46 (2000) 1751-1754
3. Benford, H. L., McGowan, N. W., Helfrich, M. H., Nuttall, M. E., Rogers, M. J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 28 (2001) 465-473
4. Bevilacqua, M. A., Lord, D. K., Cross, N. C., Whitaker, K. B., Moss, D. W., Cox, T. M. Regulation and expression of type V (tartrate-resistant) acid phosphatase in human mononuclear phagocytes. *Mol Biol Med* 8 (1991) 135-140
5. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Osteoclast function: Biology and mechanisms. In: "Principles of Bone Biology", Rodan, G. (Ed.), Academic Press, San Diego, 1996, first edition, 103-114.
6. Black, D. M., Thompson, D. E., Bauer, D. C., Ensrud, K., Musliner, T., Hochberg, M. C., Nevitt, M. C., Suryawanshi, S., Cummings, S. R. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 4118-4124
7. Blank, M. A., Gibson, G. W., Myers, W. R., Dierckman, T. A., Phipps, R. J., Smith, P. N. Gastric damage in the rat with nitrogen-containing bisphosphonates depends on pH. *Aliment Pharmacol Ther* 14 (2000) 1215-1223
8. Boissier, S., Ferreras, M., Peyruchaud, O., Magnetto, S., Ebetino, F. H., Colombel, M., Delmas, P., Delaisse, J. M., Clezardin, P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 60 (2000) 2949-2954
9. Breaudiere, J.-P., Spillman, T. Determination of Acid Phosphatases. In "Methods of Enzymatic Analysis", Bergmeyer, H. U. (Ed.), Academic Press, 1984, third edition, Vol. 4. 345-359
10. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47 (1998) 487-504
11. Chapurlat, R. D., Meunier, P. J. Fibrous dysplasia of bone [In Process Citation]. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 14 (2000) 385-398
12. Cole, A. A., Walters, L. M. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 35 (1987) 203-206
13. Coleman, R. E., Purohit, O. P., Black, C., Vinholes, J. J., Schlosser, K., Huss, H., Quinn, K. J., Kanis, J. Double-blind, randomised, placebo-controlled, dose-finding study of oral ibandronate in patients with metastatic bone disease. *Ann Oncol* 10 (1999) 311-316
14. Daley-Yates, P. T., Gifford, L. A., Hoggarth, C. R. Assay of 1-hydroxy-3-aminopropylidene-1,1-bisphosphonate and related bisphosphonates in human urine and plasma by high-performance ion chromatography. *J Chromatogr* 490 (1989) 329-338
15. David, P., Nguyen, H., Barbier, A., Baron, R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 1498-1507

16. Denk, H., Künzle, H., Plenk, H., Rüschoff, J., Sellner, W. Verarbeitung von Knochengewebe. In "Romeis - Mikroskopische Technik", Böck, P. (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore, 1989, 17. Auflage, 234-257
17. Devogelaer, J. P. Treatment of bone diseases with bisphosphonates, excluding osteoporosis [In Process Citation]. *Curr Opin Rheumatol* 12 (2000) 331-335
18. Felsenberg, D., Alenfeld, F., Bock, O., Hammermeister, C., Gowan, W. Placebo-controlled multicenter study of oral alendronate in postmenopausal osteoporotic women. FOSIT-Study-Group. Fosamax International Trial. *Maturitas* 31 (1998) 35-44
19. Fujita, T., Fujii, Y., Okada, S. F., Miyauchi, A., Takagi, Y. Analgesic effect of etidronate on degenerative joint disease. *J Bone Miner Metab* 19 (2001) 251-256
20. Gertz, B. J., Holland, S. D., Kline, W. F., Matuszewski, B. K., Porras, A. G. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int* 3 (1993) S13-16
21. Gertz, B. J., Holland, S. D., Kline, W. F., Matuszewski, B. K., Freeman, A., Quan, H., Lasseter, K. C., Mucklow, J. C., Porras, A. G. Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther* 58 (1995) 288-298
22. Greenfield, E. M., Bi, Y., Ragab, A. A., Goldberg, V. M., Van De Motter, R. R. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res* 20 (2002) 1-8
23. Greenspan, S. L., Harris, S. T., Bone, H., Miller, P. D., Orwoll, E. S., Watts, N. B., Rosen, C. J. Bisphosphonates: safety and efficacy in the treatment and prevention of osteoporosis. *Am Fam Physician* 61 (2000) 2731-2736
24. Halleen, J., Hentunen, T. A., Hellman, J., Vaananen, H. K. Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 1444-1452
25. Halleen, J. M., Hentunen, T. A., Karp, M., Kakonen, S. M., Pettersson, K., Vaananen, H. K. Characterization of serum tartrate-resistant acid phosphatase and development of a direct two-site immunoassay. *J Bone Miner Res* 13 (1998) 683-687
26. Halleen, J. M., Raisanen, S., Salo, J. J., Reddy, S. V., Roodman, G. D., Hentunen, T. A., Lehenkari, P. P., Kaija, H., Vihko, P., Vaananen, H. K. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274 (1999) 22907-22910
27. Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A. J., Vaananen, H. K. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 1337-1345
28. Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Janckila, A. J., Woitge, H. W., Seibel, M. J., Vaananen, H. K. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 47 (2001) 597-600
29. Halleen, J. M., Ranta, R. Tartrate-resistant acid phosphatase as a serum marker of bone resorption. *Am Clin Lab* 20 (2001): 29-30.
30. Harvey, D. J., Horning, M. G. Derivatives for the characterization of alkyl- and aminoalkylphosphonates by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 79 (1973) 65-74
31. Hayman, A. R., Bune, A. J., Cox, T. M. Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo. *J Anat* 196 (2000) 433-441
32. Helfrich, M. H., Mieremet, R. H. A morphologic study of osteoclasts isolated from osteopetrotic microphthalmic (mi/mi) mouse and human fetal long bones using an instrument permitting combination of light and scanning electron microscopy. *Bone* 9 (1988) 113-119
33. Hennigs, T., Arabmotlagh, M., Schwarz, A., Zichner, L. [Dose-dependent prevention of early periprosthetic bone loss by alendronate]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140 (2002) 42-47

34. Hirashima, Y., Ishiguro, N., Kondo, S., Iwata, H. Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro-inflammatory mediators from macrophages exposed to polyethylene particles: A possible mechanism of osteolysis in failed THA. *J Biomed Mater Res* 56 (2001) 177-183
35. Hofbauer, L. C., Heufelder, A. E. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000): 2355-2363
36. Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Riggs, B. L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 2-12
37. Hughes, D. E., Macdonald, B. R., Russell, R. G., Gowen, M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 83 (1989) 1930-1935
38. Huikko, K., Kostianen, R. Analysis of bisphosphonates by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 872 (2000) 289-298
39. Imhof, H., Breitenseher, M., Kainberger, F., Trattig, S. Degenerative joint disease: cartilage or vascular disease? *Skeletal Radiol* 26 (1997) 398-403
40. Imhof, H., Breitenseher, M., Kainberger, F., Rand, T., Trattig, S. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging* 10 (1999) 180-192
41. Joshi, R. R., Underwood, T., Frautschi, J. R., Phillips, R. E., Jr., Schoen, F. J., Levy, R. J. Calcification of polyurethanes implanted subdermally in rats is enhanced by calciphylaxis. *J Biomed Mater Res* 31 (1996) 201-207
42. Kanis, J. A., McCloskey, E. V. Bisphosphonates in multiple myeloma. *Cancer* 88 (2000) 3022-3032
43. Kim, Y. H., Kim, G. S., Jeong-Hwa, B. Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med* 34 (2002) 145-151
44. King, L. E., Vieth, R. Extraction and measurement of pamidronate from bone samples using automated pre-column derivatization, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 678 (1996) 325-330
45. King, L. E., Grynopas, M. D., Tomlinson, G., Vieth, R. Pamidronate content and turnover in sternum, vertebral body, and iliac bones of dogs. *Bone* 20 (1997) 405-411
46. Klein, B. Y., Ben-Bassat, H., Breuer, E., Solomon, V., Golomb, G. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *J Cell Biochem* 68 (1998) 186-194
47. Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J., Suda, T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191 (2000) 275-286
48. Kubalek, I., Fain, O., Paries, J., Kettaneh, A., Thomas, M. Treatment of reflex sympathetic dystrophy with pamidronate: 29 cases. *Rheumatology (Oxford)* 40 (2001) 1394-1397
49. Lam, W. K., Lai, L. C., Yam, L. T. Tartrate-resistant (band 5) acid phosphatase activity measured by electrophoresis on acrylamide gel. *Clin Chem* 24 (1978) 309-312
50. Lee, M. V., Fong, E. M., Singer, F. R., Guenette, R. S. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 61 (2001) 2602-2608
51. Liberman, U. A., Weiss, S. R., Broll, J., Minne, H. W., Quan, H., Bell, N. H., Rodriguez-Portales, J., Downs, R. W., Jr., Dequeker, J., Favus, M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal

- osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 333 (1995) 1437-1443
52. Lissoni, P., Cazzaniga, M., Barni, S., Perego, M. S., Brivio, F., Fumagalli, L., Tancini, G. Acute effects of pamidronate administration on serum levels of interleukin-6 in advanced solid tumour patients with bone metastases and their possible implications in the immunotherapy of cancer with interleukin-2. *Eur J Cancer* 33 (1997) 304-306
 53. Luchin, A., Suchting, S., Merson, T., Rosol, T. J., Hume, D. A., Cassady, A. I., Ostrowski, M. C. Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J Biol Chem* 276 (2001) 36703-36710
 54. Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T., Horiuchi, N. Simvastatin Promotes Osteoblast Differentiation and Mineralization in MC3T3-E1 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 874-877
 55. Makkonen, N., Salminen, A., Rogers, M. J., Frith, J. C., Urtti, A., Azhayeve, E., Monkkonen, J. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* 8 (1999) 109-118
 56. Martinez, M. E., Del Campo, M. T., Plaza, M. A., Torrijos, A., Gijon, J. Pamidronate and biochemical markers of bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 57 (1997) 581-586
 57. Mashiba, T., Turner, C. H., Hirano, T., Forwood, M. R., Johnston, C. C., Burr, D. B. Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 28 (2001) 524-531
 58. Matsumoto, M., Hisatake, K., Nogi, Y., Tsujimoto, M. Regulation of receptor activator of NF-kappaB ligand-induced tartrate-resistant acid phosphatase gene expression by PU.1-interacting protein/interferon regulatory factor-4. Synergism with microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem* 276 (2001) 33086-33092
 59. McCloskey, E. V., MacLennan, I. C., Drayson, M. T., Chapman, C., Dunn, J., Kanis, J. A. A randomized trial of the effect of clodronate on skeletal morbidity in multiple myeloma. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 100 (1998) 317-325
 60. Milz, S., Putz, R. Lückenbildung der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus. *Osteologie* 3 (1994) 110-118
 61. Minkin, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34 (1982) 285-290
 62. Monkkonen, J., Pennanen, N., Lapinjoki, S., Urtti, A. Clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) inhibits LPS-stimulated IL-6 and TNF production by RAW 264 cells. *Life Sci* 54 (1994) L229-234
 63. Moonga, B. S., Moss, D. W., Patchell, A., Zaidi, M. Intracellular regulation of enzyme secretion from rat osteoclasts and evidence for a functional role in bone resorption. *J Physiol (Lond)* 429 (1990) 29-45
 64. Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M., Gutierrez, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286 (1999) 1946-1949
 65. Murakami, H., Takahashi, N., Tanaka, S., Nakamura, I., Udagawa, N., Nakajo, S., Nakaya, K., Abe, M., Yuda, Y., Konno, F., Barbier, A., Suda, T. Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts. *Bone* 20 (1997) 399-404
 66. Nowack, B. Determination of phosphonates in natural waters by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 773 (1997) 139-146

67. Pedrazzoni, M., Alfano, F. S., Gatti, C., Fantuzzi, M., Girasole, G., Campanini, C., Basini, G., Passeri, M. Acute effects of bisphosphonates on new and traditional markers of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 57 (1995) 25-29
68. Plotkin, L. I., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Roberson, P. K., Manolagas, S. C., Bellido, T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104 (1999) 1363-1374
69. Powles, T., Paterson, S., Kanis, J. A., McCloskey, E., Ashley, S., Tidy, A., Rosenqvist, K., Smith, I., Ottestad, L., Legault, S., Pajunen, M., Nevantaus, A., Mannisto, E., Suovuori, A., Atula, S., Nevalainen, J., Pylkkanen, L. Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (2002) 3219-3224
70. Ralston, S. H., Gallacher, S. J., Patel, U., Dryburgh, F. J., Fraser, W. D., Cowan, R. A., Boyle, I. T. Comparison of three intravenous bisphosphonates in cancer-associated hypercalcaemia. *Lancet* 2 (1989) 1180-1182
71. Reimann, I., Christensen, S. B. A histochemical study of alkaline and acid phosphatase activity in subchondral bone from osteoarthrotic human hips. *Clin Orthop* (1979) 85-91
72. Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E. S., Subramaniam, M., Ingle, J. N., Spelsberg, T. C. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60 (2000) 6001-6007
73. Rogers, M. J., Chilton, K. M., Coxon, F. P., Lawry, J., Smith, M. O., Suri, S., Russell, R. G. Bisphosphonates induce apoptosis in mouse macrophage-like cells in vitro by a nitric oxide-independent mechanism. *J Bone Miner Res* 11 (1996) 1482-1491
74. Rogers, M. J., Frith, J. C., Luckman, S. P., Coxon, F. P., Benford, H. L., Monkkonen, J., Auriola, S., Chilton, K. M., Russell, R. G. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 24 (1999) 73S-79S
75. Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., Frith, J. C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 88 (2000) 2961-2978
76. Sabokbar, A., Fujikawa, Y., Murray, D. W., Athanasou, N. A. Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption. *Ann Rheum Dis* 57 (1998) 614-618
77. Santini, D., Vincenzi, B., Avvisati, G., Dicuonzo, G., Battistoni, F., Gavasci, M., Salerno, A., Denaro, V., Tonini, G. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 1080-1084
78. Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E., Rodan, G. A. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88 (1991) 2095-2105
79. Sauty, A., Pecherstorfer, M., Zimmer-Roth, I., Fioroni, P., Juillerat, L., Markert, M., Ludwig, H., Leuenberger, P., Burckhardt, P., Thiebaud, D. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 18 (1996) 133-139
80. Scarnecchia, L., Minisola, S., Pacitti, M. T., Carnevale, V., Romagnoli, E., Rosso, R., Mazzuoli, G. F. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 51 (1991) 517-524
81. Schenk, R., Merz, W. A., Muhlbauer, R., Russell, R. G., Fleisch, H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 11 (1973) 196-214

82. Schneider, U., Breusch, S. J., Termath, S., Thomsen, M., Brocai, D. R., Niethard, F. U., Kasperk, C. Increased urinary crosslink levels in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 13 (1998) 687-692
83. Schwarz, E. M., Lu, A. P., Goater, J. J., Benz, E. B., Kollias, G., Rosier, R. N., Puzas, J. E., O'keefe, R. J. Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18 (2000) 472-480
84. Senaratne, S. G., Pirianov, G., Mansi, J. L., Arnett, T. R., Colston, K. W. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 82 (2000) 1459-1468
85. Shanbhag, A. S., Hasselman, C. T., Rubash, H. E. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clin Orthop* (1997) 33-43
86. Sparidans, R. W., Den Hartigh, J. Chromatographic analysis of bisphosphonates. *Pharm World Sci* 21 (1999) 1-10
87. Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S., Oikawa, S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271 (2000) 688-692
88. Sun, Y. C., Geldof, A. A., Newling, D. W., Rao, B. R. Progression delay of prostate tumor skeletal metastasis effects by bisphosphonates. *J Urol* 148 (1992) 1270-1273
89. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58 (1989) 573-581
90. Tassone, P., Forciniti, S., Galea, E., Morrone, G., Turco, M. C., Martinelli, V., Tagliaferri, P., Venuta, S. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia* 14 (2000) 841-844
91. Thompson, S. W., Tonge, D. Bone cancer gain without the pain. *Nat Med* 6 (2000) 504-505
92. Tondravi, M. M., Mckercher, S. R., Anderson, K., Erdmann, J. M., Quiroz, M., Maki, R., Teitelbaum, S. L. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386 (1997) 81-84
93. Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T. J., Suda, T. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 125 (1989) 1805-1813
94. Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., Nakagawa, N., Yasuda, H., Goto, M., Tsuda, E., Higashio, K., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Suda, T. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25 (1999) 517-523
95. Usui, T., Watanabe, T., Higuchi, S. Determination of a new bisphosphonate, YM175, in plasma, urine and bone by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 584 (1992) 213-220
96. Usui, T., Kawakami, R., Watanabe, T., Higuchi, S. Sensitive determination of a novel bisphosphonate, YM529, in plasma, urine and bone by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 652 (1994) 67-72
97. Venesmaa, P. K., Kroger, H. P., Miettinen, H. J., Jurvelin, J. S., Suomalainen, O. T., Alhava, E. M. Alendronate reduces periprosthetic bone loss after uncemented primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study. *J Bone Miner Res* 16 (2001) 2126-2131

98. Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K. H., Blaschke, S., Grundker, C., Hofbauer, L. C. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (2002) 680-686
99. Virtanen, V., Lajunen, L. H. Spectrophotometric determination of clodronate with thorium-morin. *Acta Chem Scand* 47 (1993) 89-91
100. Virtanen, V., Pursiainen, J., Lajunen, L. H. Complexometric determination of clodronate in aqueous solutions and urine. *Acta Chem Scand* 47 (1993) 1071-1077
101. Wang, P. S., Solomon, D. H., Mogun, H., Avorn, J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *Jama* 283 (2000) 3211-3216
102. Wang, X., Shanbhag, A. S., Rubash, H. E., Agrawal, C. M. Short-term effects of bisphosphonates on the biomechanical properties of canine bone. *J Biomed Mater Res* 44 (1999) 456-460
103. Wilkinson, J. M., Stockley, I., Peel, N. F., Hamer, A. J., Elson, R. A., Barrington, N. A., Eastell, R. Effect of pamidronate in preventing local bone loss after total hip arthroplasty: a randomized, double-blind, controlled trial. *J Bone Miner Res* 16 (2001) 556-564
104. Yoneda, T., Michigami, T., Yi, B., Williams, P. J., Niewolna, M., Hiraga, T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer* 88 (2000) 2979-2988
105. Yutani, Y., Ohashi, H., Nishimura, N., Yamano, Y. Clinical effect of etidronate disodium (EHDP) on heterotopic ossification following total hip arthroplasty. *Osaka City Med J* 41 (1995) 63-73
106. Zaidi, M., Moonga, B., Moss, D. W., Macintyre, I. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 159 (1989) 68-71.

7. Anhang (siehe beigelegte CD-ROM)

8. Danksagung

Meinen Dank möchte ich all denen aussprechen, die mir sowohl bei der praktischen Ausführung als auch beim Verfassen dieser Dissertationsarbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Stemberger für seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit. Durch seine ständige Bereitschaft zur Diskussion bereicherte er meine Arbeit und unterstützte mich als fachlicher und freundschaftlicher Ratgeber unter grossem Zeiteinsatz.

Bedanken möchte ich mich ebenso herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. H. Rechl für das freundliche Überlassen des Themas, für die klinische Betreuung und die bemerkenswerte Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung .

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. A. Stemberger und Prof. Dr. med. Dr. med. vet. H. Rechl haben in ausgezeichneter Weise mein Interesse an der medizinischen Wissenschaft geweckt und mich immer wieder bestärkt und ermutigt, dieses Interesse weiter zu verfolgen. Mit dieser Ausbildung legten sie einen Grundstein für die Fortsetzung meines beruflichen Werdegangs.

Daneben gilt mein aufrichtiger Dank Frau S. Mitterer und Herrn Dr. med. vet. J. Maierl, Lehrstuhl für Tieranatomie I der LMU München, die mich in die Methodik der Hartschnitthistologie einführten und bei der Ausführung meiner histologischen Untersuchungen jederzeit wertvolle Ansprechpartner für mich waren. Ebenso bedanke ich mich bei Frau J. Tübel für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Auch möchte ich dem Personal des orthopädischen OPs und der orthopädischen Ambulanz danken, die zur Organisationsarbeit meiner Dissertation beitrugen.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. med. Dominik Hartl danken, der mich in Fragen der medizinischen Statistik beriet und mir immer als wissenschaftlicher Diskussionspartner zur Seite stand. Grösster Dank gebührt auch meiner lieben Freundin Frau Dr. med. Martina Ilic und meinen Eltern, Frau Dr. med. Christa und Herrn Dr. med. Dieter Mehlhorn, die mich in jeder Phase dieser Dissertationsarbeit mit viel Rat und Tat unterstützten.