

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

Die Überbrückung größerer Knochendefekte, welche z.B. bei Traumen oder der operativen Sanierung von Knochentumoren entstehen, benötigt oftmals neben der Stabilisierung zusätzliches Material zum Ausfüllen des Defektes, um dessen Heilung zu erleichtern. Als Goldstandard gilt bisher die Transplantation autologer Knochenspongiosa. Jedoch ist deren Gewinnung mit einer gewissen Morbidität verbunden, kann es doch zu nicht unerheblichen Blutverlusten (einige 100 ml) neben den ohnehin verursachten eventuell lang dauernden Schmerzen kommen. Die Inzidenz lokaler Komplikationen, wie Hämatom, Serom, Wundinfektion oder Läsion des N. cutaneus femoris lat. bei Entnahme aus dem Beckenkamm, wird in der Literatur mit bis zu 70% angegeben [1]. Wichtigster Nachteil ist die Begrenztheit des zu gewinnenden Materials. Eine gute Alternative stellt allogener Spenderknochen dar. Es besteht bei der Knochentransplantation wegen geringer Ansprüche an die genetische Kompatibilität weder die Gefahr einer Abstoßungsreaktion, noch ist eine immunsuppressive Therapie notwendig. Nachteilig sind das nicht auszuschließende Restrisiko des Empfängers einer transplantatübertragenen Infektion (z.B. Hepatitis C oder HIV) und der erhebliche administrative und finanzielle Aufwand zum Unterhalt einer Knochenbank.

Es wurden und werden daher eine Vielzahl von synthetischen Knochenersatzstoffen entwickelt und optimiert, welche alle anstreben, in ihrer Funktion autologem Knochen möglichst nahe zu kommen. Exemplarisch genannt seien Keramiken, Biogläser und synthetische Polymere. Experimentelle Daten und klinische Anwendung finden sich auch für insbesondere auf Typ I Kollagen basierenden Biomaterialien und extrazellulärer, demineralisierter Knochenmatrix [2-4]. Ein neuerer Forschungsansatz ist das „tissue engineering“, welches aber neben den nicht unbeträchtlichen Kosten und der nicht ubiquitären Verfügbarkeit von der klinischen Anwendung noch weit entfernt ist [5].

Es besteht weiterhin noch erheblicher Forschungsbedarf in der Grundlagenmedizin über Aufbau, Umbau, Heilung von Knochen und über die Wirkungsweise allogener Materialien.

1.2 Stand der Forschung

Hydroxylapatit (HA) wird seit Jahren in verschiedenen medizinischen Disziplinen mit Erfolg als Knochenersatzstoff, als Granulat oder geformtes Implantat, angewendet (z.B. Endobon[®], Merck Biomaterialien, Darmstadt, Deutschland; Algipore[®], Friedrichsfeld GmbH, Mannheim) [6;7]. Dies beruht auf einer ausgezeichneten Gewebeverträglichkeit und den seit 1981 bekannten knochenbindenden Eigenschaften [8;9]. Eine physiko-chemische Knochenbindung wird dabei teils über eine partielle Degradation der Implantatoberfläche und nachfolgende Verbindung mit afibrillärem Calciumphosphat (Ca/P) präosteoblastären Ursprungs erstellt. Diese afibrilläre, von Anbauzonen des Lamellenknochens her bekannte Kittlinie ist damit ein Interface wie zwischen zwei Anteilen von Knochen im Lamellenknochen [10-12]. Die Degradationsrate unterschiedlicher HA variiert in Abhängigkeit von den Materialeigenschaften, wie z.B. Dichte, Verunreinigungen mit anderen Ca/P-Phasen, Mikro- und Makroporosität, Kristallinität, aber auch der Größe einzelner HA-Partikel, während die Knochenbindung davon nicht entscheidend beeinflusst wird [9;13-16].

Ein mikrokristalliner HA mit Partikelgrößen von ca. 10 x 50 nm wird neben anderen Mechanismen, wie Dissolution durch interzelluläre Flüssigkeit, aktiv von multinukleären Zellen und Osteoklasten wie Knochen resorbiert und degradiert [10;17;18]. Steigt die Kristallgröße auf 0,1 bis 0,3 µm, ist die Resorption durch Zellen deutlich reduziert [9].

Menschliche HA-Kristalle weisen, wie aus früheren Untersuchungen bekannt, durchschnittliche Dimensionen von 25 x 3,5 nm auf [19]. Im Alveolarfortsatz wurden Längen von 47 nm gemessen [20]. Diese Größen sind jedoch variabel, schwanken mit dem Alter und bei bestimmten Erkrankungen. Demgegenüber bestehen synthetisch hergestellte Apatite, welche chemisch der anorganischen Phase des Knochens entsprechen, meist aus polygonalen gesinterten Partikeln, die sich in Form und Größe bisher signifikant vom HA des Knochens unterscheiden.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Implantate im Knochen mit Partikelgrößen über 0,1 µm nur spärlich degradiert wurden [9]. Bei Partikelgrößen zwischen 1-3 µm fanden sich bis 100 µm lange Zellsynzytien mit den Charakteristika von Fremdkörperriesenzellen [21]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Zhang et al. [11] mit Kompositen aus HA/β-Tricalciumphosphatkeramik (70/30 Volumen%) mit Partikelgrößen

um 0,5 µm. Hier wurden nur oberflächliche Degradationsphänomene an einzelnen Partikeln beobachtet.

Im Idealfall sollte ein Implantat bei guter Histokompatibilität die Regeneration organotypischen Gewebes nicht nur in der Implantatumgebung, sondern auch gerichtet durch dessen sukzessiven Abbau und damit zumindest dessen partiellen Ersatz ermöglichen. Das Implantat sollte als „eigener Knochen“ erkannt und in die natürlichen Ab- und Umbauvorgänge einbezogen werden. Dies kann bei ungenügender Degradation nicht geschehen.

Es wurde daher eine neue Gruppe von HA (Nanoapatit) mit einer dem menschlichen HA entsprechenden Kristallgröße und damit, wie aus vorläufigen Untersuchungen bekannt, besseren Degradierbarkeit [18] entwickelt. Es konnten durch Zusatz einer organischen Komponente zur Implantatmatrix (Organoapatit) sowohl die Knochenbindung als auch Degradation beeinflusst werden. Weiterhin lassen sich durch den Zusatz organischer Komponenten die Festigkeit und Materialeigenschaften verändern [10]. In Versuchen ließen sich die chemischen (Wasserlöslichkeit) und physikalischen (Scherkraftwiderstand, Fragmentationsindex) Eigenschaften von Nanoapatitimplantaten durch Zusatz von 2-3% Poly-L-Lysin, Poly-Na-Glutamat oder Poly-Na-Acrylat zur Präzipitatemulsion in vitro wie in vivo deutlich verbessern [22]. Die Knochenbindung unterschied sich nicht unter den Materialien bis auf Poly-Na-Acrylat, welches fibrös umschieden war und weniger Knochenbindung zeigte [23]. Schon ein geringer Zusatz kann somit das biologische Verhalten erheblich verändern. Es eröffnen sich hierdurch weitreichende Möglichkeiten, da durch Zusatz einer organischen Komponente zur Implantatmatrix die Bindung und steuerbare Freisetzung von pharmakologisch aktiven Substanzen ermöglicht wird. Andererseits könnte eine Steuerbarkeit der Degradationsrate sowie der Festigkeit realisiert werden. Es könnten das Wachstum fördernde Substanzen, Antibiotika oder antiinflammatorische Substanzen bevorzugt lokal wirksam werden unter Verringerung systemischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen.

Hinsichtlich der lokalen Antibiotika-Applikation werden Gentamicin-Ketten bereits im klinischen Alltag eingesetzt. Neuere Forschungsvorhaben versuchen Drug-Carrier-Systeme zu entwickeln. Die Pharmakokinetik und -dynamik der Substanzen im Zusammenspiel von Implantatmaterial und Körper sind Gegenstand der Forschung. So war die Freisetzung von

Gentamicin aus Implantaten, die durch Copräzipitation von 25% HA und 75% Tricalciumphosphat (TCP) mit 3,5% Gentamicin mit und ohne Poly-DL-Milchsäure-Überzug produziert wurden, in vivo schneller als in vitro. Der Milchsäureüberzug verzögerte die Freisetzung [24]. Dies zeigt den Einfluß plasmatischer und zellulärer Mechanismen. Teicoplanin zeigte sich in HA-Zement für Monate stabil, eine wichtige Voraussetzung für langdauernde Wirkung [25]. Antientzündliche, knochenwachstumsfördernde Substanzen, wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β), wurden in verschiedenen Trägern untersucht. In HA/TCP zeigte sich eine konzentrationsabhängig gesteigerte Knochenbildung im Tierversuch [26]. In vitro zeigten sich bei den klinisch eingesetzten Endobon[®], Bio-Oss[®] und Aligipore[®] materialabhängige Freisetzungsraten (Aligipore schneller als die anderen) [27]. In einer anderen in vitro Untersuchung wurde die Freisetzung und Struktur von Bone Morphogenetic Protein-4 (rhBMP-4), Basic Fibroblast Growth Factor (rh-bFGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (rh-VEGF) aus alpha-TCP, der Glaskeramik GB9N und einem Komposit aus Polylactat/Glycolid/GB9N untersucht. Es zeigte sich eine 2-Phasen-Freisetzungskinetik mit einer schnellen Freisetzung in den ersten Stunden und einem dann folgenden linearen Abfall, der von Material und Wachstumsfaktor abhängig war. BMP und bFGF waren nach der Freisetzung in kleine Bruchstücke aufgespalten, VEGF wurde nur in kleinere Teile aufgespalten [28]. Derartige Veränderungen und ihre Auswirkungen auf die biologische Aktivität müssen zusätzlich berücksichtigt werden. Auch beim Menschen zeigten BMP-1 beladene 60%HA/40%TCP-Implantate zur Wirbelkörperfusion signifikant bessere Ergebnisse als die Kontrolle ohne BMP [29]. Im Tierversuch konnte durch Zusatz von BMP-7 zu HA-Implantaten ein osteoinduktiver Effekt erzielt werden. Durch knöchernen Um- und Durchbau des Implantats im Gegensatz zur Kontrolle ohne BMP wurde deutlich weniger Implantatfrakturierung mit subsequenter Fragmentation und Entzündung gesehen [28].

Bei den bisher verwendeten Materialien wurden die Knochenersatzstoffe mit den jeweiligen Faktoren in Lösung inkubiert oder allenfalls copräzipitiert, mit einer daraus resultierenden 2-Phasenkinetik. In der vorliegenden Untersuchung wurden der o.g. neuen Gruppe von nanokristallinen Organoapatiten die drei organischen Zusätze L-Lysin, HEMA und Indomethacin/HEMA/Tyrosin während der Copräzipitation zugesetzt und polymerisiert. Diese waren daher fest im Kristallgerüst verankert. Das Indomethacin lag kovalent an das Polymer gebunden vor. Es wird angenommen, dass es dadurch kontrolliert, gleichmäßiger und länger freigesetzt wird.

Das die Aminosäure L-Lysin enthaltende Apatit diente als Kontrolle. L-Lysin wurde während der Präzipitation der Kristalle im Kristallgitter zu Poly-L-Lysin polymerisiert. Dieses Implantatmaterial hatte in vorangehenden Untersuchungen bei guter Implantatstabilität (niedriger Fragmentationsindex) eine gute Knochenbindung gezeigt [10]. Poly-L-Lysin ist aufgrund seiner guten Gewebeverträglichkeit gern benutztes Beschichtungsmittel für Biomaterialien, wie z.B. eingekapselte hormonfreisetzende Zellpräparationen [30;31]. Neben den o.g. Eigenschaften ist diese Aminosäure häufig in Kollagen vertreten und durch Hydrolyse freigesetztes Lysin könnte das Angebot dieses Precursors erhöhen und somit möglicherweise die Kollagen- / Knochenbildung fördern.

Da der in diesem Versuch vorliegende HA eine sehr bröckelige Konsistenz aufwies, wurde zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften ein weiteres Organoapatit mit dem Knochenzement Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) in der organischen Phase hergestellt [32]. HEMA-Polymere wurden erstmals von Wichterle und Lim 1960 als nützliche Biomaterialien eingeführt [33]. Seither sind viele Veröffentlichungen erschienen bezüglich ihres Einsatzes als neue Biomaterialien bei weichen Kontaktlinsen, intraokulären Linsen, künstlichen Organen und Drug-Carrier-Systemen, z.B. zur Kontrazeption [34-38].

Poly-HEMA hat sich in vielen Untersuchungen als sehr gut biokompatibel erwiesen, was auch auf seiner relativen Hydrophilie beruht. Es aktiviert das Komplementsystem nicht. In Form eines Hydrogels hat es ähnliche Eigenschaften wie lebendes Gewebe, hat einen hohen Wassergehalt und eine weiche gummiartige Konsistenz. Es ist andererseits hochresistent gegenüber enzymatischer Verdauung und zellulärer Phagozytose [39]. Wird der Monomer (HEMA) in wasserfreier Umgebung polymerisiert, hat Poly-HEMA (pHEMA) eine dem Knochen vergleichbare Härte und kann als Knochenersatzstoff auch in belasteten Defekten eingesetzt werden.

Die Literatur ist uneinheitlich in der Bewertung des Zellbewuchses. In einigen Arbeiten wurde kein Zellbewuchs gesehen. Dies wurde mit den zahlreichen Alkoholgruppen begründet, die Wachstum und Ausbreitung verhindern sollen [39]. In anderen Arbeiten konnte z.B. auf intraokulären HEMA-Linsen sowie auf HEMA-beschichteten Gefäßprothesen ein Zellbewuchs nachgewiesen werden, während auf den damit verglichenen hydrophoben Biomaterialien, wie Silicon oder Polymethylmethacrylat (PMMA), kaum Zellbewuchs

gesehen wurde. Dies wurde mit der relativen Hydrophilie des Materials HEMA begründet [40-42]. Als Beschichtung kann HEMA die Biokompatibilität von anderen Biomaterialien (z.B. Silicon) erhöhen [43]. Nach Implantation zeigten sich nur eine geringe entzündliche Reaktion und geringe (11 µm nach 6 Monaten bei Ratten) bis keine fibröse Umscheidung oder Abkapselung [39;43]. Bei Langzeitanwendung waren extraossär Verkalkungen des Hydrogels beobachtet worden [44].

Auch hinsichtlich der Reaktion im Knochen ist die Literatur widersprüchlich. Einigkeit herrscht über die gute Biokompatibilität ohne Induktion einer Entzündung oder degenerativer Veränderungen über die Zeit. Es wurden einerseits an Poly-HEMA-Hydrogel Knochenapposition und sogar knöcherne Durchbauung sowie zelluläre Phagozytose und Abbau beobachtet [45]. Es zeigten sich Kalzifizierungen (Hydroxyapatitkristallen entsprechend), aber keine Stimulation der Knochenbildung oder von Osteoblasten [46]. Andererseits reicht das Spektrum bis biologisch inert und stabil, sich zellulärer Degradation widersetzt und teils Knochenbildung inhibierend [47].

Der Zusatz von z.B. Karbonfasern oder Kollagenfasern kann die Eigenschaften von HEMA verändern. Implantate mit Beimischungen unterschiedlicher Mengen fibrillären Kollagens zeigten nach 3 Monaten eine Resorption des fibrillären Kollagens durch eingewanderte Zellen, der synthetische Rest widerstand einer Biodegradation. Ein Teil des Poly-HEMA lag als Residuen in Form von „spherical particles“ mit 1-15 µm Durchmesser im Gewebe vor, deren weiterer Verbleib im Organismus nicht letztlich geklärt ist. Eine Stimulation der Knochenbildung wurde schon ab einem 1%igen Kollagen- Zusatz gesehen [39;47;48].

Es wurde weiterhin versucht, durch Zusatz von Hydroxylapatitpartikeln die biologischen und mechanischen Eigenschaften zu verbessern [49;50]. Es konnte gezeigt werden, dass Apatit chemisch an die Methacrylat-Matrix gebunden ist und diese versteift [51]. Im Tiermodell konnte eine Bindung zwischen den HA-Partikeln und umgebendem Knochen / fibrösem Gewebe nachgewiesen und sogar Interdigitationen zwischen Zement und Knochen beobachtet werden. Die Knochenapposition und die Bindung zwischen Knochen und Zement, welche die Langzeitstabilität erhöhen, wurden verbessert. In vitro konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von HA zu Polymethylmethacrylat (PMMA), einer dem HEMA verwandten Substanz, eine stärkere Osteoblastenproliferation, ein organisierteres Fibronectin-Netzwerk und eine bessere Mineralisation der gebildeten Knochenmatrix induzierte als PMMA allein. Bei der

Osteoblastenproliferation wurde damit das gleiche Niveau erreicht wie auf purem Titan und bei der Kontrolle ohne Zusatz [52].

Durch Anreicherung von alkalischer Phosphatase in pHEMA (Hybrid-Polymer) konnte in vitro die Mineralisation des Polymers und der Umgebung initiiert und um das 20-fache gesteigert werden. Weniger stark ausgeprägt war der Effekt durch Einbringung negativ geladener Gruppen in die sonst neutrale Oberfläche mit einer Steigerung um das 2- bis 15-fache. Der Mineralisationsprozess entsprach dem von Knorpel oder Geflechtknochen [53].

HEMA-Polymere mit Poren sind weiterhin zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen, Hormonen und Medikamenten entwickelt worden, wobei die Freisetzung von der Porengröße und Ladung des Polymers, die sich aus dessen Zusammensetzung ergibt, bestimmt wird [34-37;54].

Auch unterschiedlichen Knochenzementen sind knochenbildungsfördernde Substanzen, wie z.B. Wachstumshormon [55-57], zugesetzt worden, die die Knochenbindung signifikant steigern konnten. Auch hier fand sich eine unterschiedliche Freisetzung und Bioaktivität, da die Zusätze sowohl bei Inkorporation als auch beim Auswaschen verändert werden können. Es zeigte sich in einer in vitro-Untersuchung, dass bei dem getesteten hydrophilsten (HEMA) und hydrophobsten (n-Butylmethacrylat) Zement die Hormonfreisetzung jeweils am geringsten und die Zytotoxizität, die mit einem ESTA-Bioassay aus einem Eluat des entsprechenden Polymers bestimmt worden war, am größten war. Mischungen zeigten eine höhere Bioaktivität und geringere Zytotoxizität. Auffällig war eine sehr geringe biologische Aktivität des freigesetzten Hormons (sehr kleine Bioaktivitäts-/Immunoaktivitäts-Ratio) bei der hydrophilsten Form der Polymere. Offensichtlich war das Hormon vulnerabel gegenüber Prozessen bei der Inkorporation in die Matrix [58].

Bei vaskulären Prothesen wurde versucht, die Thrombogenität von HEMA durch kovalente Bindung von Acetylsalicylsäure (ASS), einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum, weiter herabzusetzen. Dies führte in vitro zwar zu einer verringerten Thrombogenität gegenüber Plättchen-angereichertem Plasma, in vivo zeigte sich jedoch ein thrombogener Effekt. Dies wurde über die mögliche Hydrolyse der ASS-Moleküle und dann freiliegender negativer Oberflächenladungen erklärt. Nach 14 Tagen konnte eine Neointimabildung um den Thrombusbelag beobachtet werden [59]. Es ließ sich so zeigen, dass Substanzen kovalent an HEMA gebunden und später durch Hydrolyse oder enzymatische Abspaltung wieder freigesetzt werden können. Ein Zellbewuchs war möglich.

Durch das Operationstrauma, aber auch bei partikulärem Zerfall, kommt es zu einer entzündlichen Reaktion, welche die Knochenbildung initial behindern kann. Aufgrund dieser Beobachtungen und den guten Erfahrungen, die man mit einer systemischen Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) in der Traumatologie nach Osteosynthesen gemacht hatte, wurde ein Implantat mit der antiinflammatorischen Substanz Indomethacin aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika hergestellt. Eine Neuerung ist hierbei, dass das Indomethacin kovalent an HEMA gebunden in der Implantatmatrix vorliegt. Es wird durch Hydrolyse chemisch oder enzymatisch ausgewaschen und seine Freisetzung kann so lokal gesteuert werden. Der bisherige Einsatz war entweder auf systemische Gabe oder biodegradierbare Freisetzungssysteme aus z.B. Polyorthoester beschränkt [60]. Es können so lokal deutlich höhere Wirkspiegel erreicht und systemische Nebenwirkungen vermieden werden. Man erhoffte sich neben der antiphlogistischen Wirkung auch positive Einflüsse durch Beeinflussung der lokalen Mediatorebene.

Die Literatur über die Pharmakodynamik von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) wie Indomethacin am Knochen ist widersprüchlich.

Grundlage der Wirkung ist die reversible Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2. Diese synthetisiert Prostaglandine und Thromboxan aus Arachidonsäure, einer Fettsäure der Zellwand. Diese haben vielfältige Wirkungen als Entzündungsmediatoren, spielen aber auch als Mediatoren im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle. Indomethacin inhibiert die Bildung von traumatisch / entzündungsbedingtem Ödem sowie die Migration und Akkumulation von Entzündungszellen [61;62]. Die Rolle der nach Fraktur auftretenden Entzündung wurde z.T. als Initiator der Frakturreparaturmechanismen angesehen. So wurden entzündliche Reaktionen in den ersten Tagen auch bei durch demineralisierte Knochenmatrix induzierter Osteogenese beobachtet [63;64]. Andererseits sind Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF) alpha und Interleukin (IL)-1 potente Stimulatoren der Osteoklastogenese und Aktivierung von Osteoblasten. So scheint TNF- α eine Implantatlockerung durch lokale Sekretion zu mediiieren [65] und ebenso bei der Periodontitis eine schnelle Osteoklastogenese über den p55 TNF-Rezeptor zu initiieren und aufrechtzuerhalten [66]. Im weiteren stimuliert er osteoblastäre Zellen zur Expression von RANKL [67], dem Receptor for Activation of Nuclear Factor Kappa B Liganden, einem zentralen Botenstoff zur Initiierung der Osteoklastogenese, der an RANK, einem Rezeptor

aus der Subfamilie der TNF-Rezeptoren, bindet. TNF stimuliert auch die Bildung von Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF). Beide fördern ihrerseits die Bildung von Osteoklasten aus Makrophagen. Direkter regulativer Gegenspieler von RANKL ist Osteoprotegerin (OPG), ein neutralisierender, löslicher Rezeptor, der die RANK-Aktivität blocken kann [68]. IL-1 stimuliert wie TNF die Expression von M-CSF von Knochenmarkstromazellen [69]. Es wird angenommen, dass auch IL-1 direkt auf Osteoklasten wirkt.

Prostaglandine (PG) der E-Familie, insbesondere PGE1 und PGE2, sind potente Regulatoren von Knochenbildung und -resorption. PGs sind in entzündlichen Exsudaten enthalten und werden nach Fraktur aus Knochen und Muskelgewebe freigesetzt [70]. PGs induzieren Knochenbildung in vivo [71] sowie in vitro [72] und haben vielfältigste Einflüsse auf osteoblastäre Zelllinien durch Stimulation der DNA- und Kollagen-Synthese, Erhöhung der alkalischen-Phosphatase-Aktivität in Zell- und Organkulturen [73-78] und Induktion von Wachstumsfaktoren, wie Insulin-like-Growth-Factor-I [79]. Sie blockieren weiterhin die Apoptose von Osteoblasten [80]. Durch Indomethacingabe vor mechanischer Belastung kann die anabole Reaktion des Knochens inhibiert werden, nicht jedoch durch Gabe nach Belastung. PGs wirken demnach in der frühen Phase an der anabolen Reaktion des Knochens mit [81], was mit Untersuchungen übereinstimmt, in denen es zu einem starken Anstieg der PG-Synthese nach Belastung von Osteoblasten oder Knochen in vitro kommt [82;83].

Darauf fußend lässt sich die in vielen Studien gezeigte protektive Wirkung von Indomethacin als Kurzzeitprophylaxe gegen heterotope Ossifikation nach prothetischem Hüftersatz (TEP) erklären. Hierbei wird unerwünschterweise die Knochenheilung und das Remodelling um das Implantat verzögert bis inhibiert. Die Dauer der Gabe korrelierte invers mit dem knöchernen Einwachsen des Implantates (je länger desto schlechter) ohne jedoch andererseits die Stabilität / Stärke des Interfaces zu beeinträchtigen [84;85]. Indomethacin hemmt auch die Ossifikation durch direkte elektrische Stimulation [86] sowie durch demineralisierte Knochenmatrix [87]. Nach Osteotomie der Tibia ließ sich nach 6-wöchiger Indomethacin-Gabe sogar eine reduzierte Biegesteifigkeit neben einem reduzierten knöchernen Einwachsen in poröse Implantate zeigen [88].

In Einklang mit der anabolen Wirkung der PG am Knochen steht, dass Wachstumsfaktoren ihrerseits die PG-Produktion stimulieren können [89-93], während andererseits PGs die

Wachstumsfaktorsynthese von osteoblastären Zellen induzieren können [79;94]. Daher konnte mit Indomethacin in vivo die durch Wachstumsfaktoren, welche in demineralisierten Knochenimplantaten enthalten waren, stimulierte heterotope Knochenbildung unterdrückt werden [95;96].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Prostaglandin G/H-Synthetase II, ein im Knochen induzierbares Enzym, einer Autoamplifikation durch seine eigenen Produkte unterworfen ist und sich damit selbst perpetuieren kann [97].

Andererseits können PGs in vitro auch Knochenresorption induzieren [98;99], welche nach der „Frostschen Regel“ einer Knochenapposition vorausgeht [100]. Die schnelle Knochenresorption kultivierter Mäuseschädelknochen wird durch Gabe von Arachidonsäure, dem PG-Precursor, verstärkt [101], während sie durch Indomethacin inhibiert [102] wird. Rezeptoren für PG finden sich auf den Zellmembranen von Osteoblasten und Osteoklasten. PGs, einschließlich PGE₂, führen zur osteoklastären Resorption von intaktem Knochen. Dieser Effekt soll durch Osteoblasten vermittelt sein, da in Abwesenheit von Osteoblasten PGE₂ in vitro auf Osteoklasten direkt inhibitorisch wirkt, ein Effekt ähnlich dem von Calcitonin [101-103]. PGE₂ vermittelt seine Effekte über 4 Rezeptorsubtypen (EP 1 - 4). In vitro konnte gezeigt werden, dass insbesondere der EP4-Rezeptor die Osteoklastenaktivierung induziert und dass EP4 in Osteoklasten exprimiert wird. Die Wirkung von IL-1 α , TNF- α , basic Fibroblast Growth Factor und Lipopolysacchariden wird über den EP4-Rezeptor mediiert, da in EP4-knock-out-Mäusen keine Osteoklastenbildung durch diese Moleküle induziert werden konnte, während Vitamin D₃- und Calcitonin-induzierte Osteoklastenbildung nur gering reduziert waren [104].

Durch tägliche Gabe von Indomethacin bei paraplegischen Ratten konnte der Knochenabbau durch Immobilisation für 42 Tage inhibiert werden [105]. Klinisch konnte durch das NSAID Diclofenac bei postmenopausalen Frauen mit hohem Knochenumsatz sowohl die Kalziumkonzentration als auch die Ausscheidung der quervernetzten N-Telopeptide im Urin als Surrogatmarker für Knochenabbau, ähnlich wie durch Gabe von Östrogenen, reduziert werden [106]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten einen dosisabhängigen Effekt von Indomethacin (und anderen NSAID) nachweisen. Je höher die Dosis, desto stärker die Inhibition mit einer fast kompletten Blockade bei der Höchstdosis (7,5mg/kg KG/d). Man fand ebenfalls eine progressive Reduzierung der absoluten Osteoklastenzahl.

Pathophysiologisch sind eine Inhibition der Rekrutierung von Präosteoklasten als auch / oder Einschränkung der präosteoklastären Differenzierung in multinukleäre Osteoklasten denkbar. Die Aktivierung von differenzierten Osteoklasten war eingeschränkt, während die eigentliche Osteoklastenaktivität unbeeinflusst blieb [107]. Der Effekt ist zeitabhängig, nämlich am stärksten am 3. und 4. Tag nach Beginn des Remodelling, also zur Zeit der maximalen Osteoklastenrekrutierung und wenn diese die Knochenoberfläche erreichen [108;109]. Ähnliche Ergebnisse der Inhibition des Knochenabbaus konnten bei Hamstern mit Periodontitis erzielt werden [110]. Nach 4 Tagen ließ die inhibitorische Wirkung nach. Dieses Escape-Phänomen ließ sich in gleicher Dosierung auch in einem Rattenmodell mit mechanisch induzierter Zahnbewegung zeigen [111]. Da sich keine komplette Inhibition auch bei hohen Dosen bis 20mg/kg KG [112] erreichen ließ, muss mindestens ein weiterer PG-unabhängiger Aktivierungsweg für Osteoklasten bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 spät in den Prozess der Osteoklastenbildung und -aktivierung eingriff, wenn endogene PGs inhibiert worden waren [113].

Die PGs spielen dabei aber nur eine Rolle in einem großen Netzwerk von Interleukinen. Neben den oben genannten seien als weitere osteoklastogene Zytokine noch IL-6, IL-11, IL-13, IL-17 zu erwähnen [114]. Als inhibitorische Zytokine von Osteoklasten seien Interferon- γ , Transforming Growth Factor β (TGF- β), IL-12 und 18, welches über eine T-Zellen-medierte Produktion von Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) wirkt, aber auch proinflammatorische Eigenschaften haben kann, genannt [115;116]. Angenommen wird eine breite Kaskade von Stimulatoren und Inhibitoren der Osteoklastenbildung, welche auf dem OPG / RANKL / RANK-Mediatorweg konvergieren.

Ein rein vaskulärer Effekt in der frühen Phase der Knochenheilung konnte in einem Kaninchenmodell nach genagelter Tibiaosteotomie und Messung des Blutflusses ausgeschlossen werden, da weder die Gabe von Indomethacin noch die intraarterielle Infusion von PGE₂ die Durchblutung in der Osteotomiegegend beeinflusste. Die PGE₂-Infusion steigerte jedoch an allen anderen Stellen des Knochens, dem Knochenmark und den Muskeln den Blutfluss [117].

Es scheinen unterschiedliche NSAID jedoch auch unterschiedliche Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu haben. In einer Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von

NSAID auf den knochenbildungsinduzierenden Effekt von demineralisierter Knochenmatrix in einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass die präimplantative Applikation von 50mg/kg KG Paracetamol, Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen knochenbildungsverstärkende, 4mg/kg KG Indomethacin oder Piroxicam inhibitorische Effekte hatte. Flurbiprofen in Dosierungen von 0,02mg/kg, 0,4mg/kg und 8mg/kg KG zeigte keinen Einfluß auf die Knochenbildung. Keines der Medikamente hatte bei Gabe nach Implantation einen Effekt auf die Knochenbildung. Somit sind, wie dies auch bei der Knochenresorption gezeigt werden konnte, offenbar nur frühe Stadien der Knochenbildung PG abhängig und möglicherweise besteht eine Dosisabhängigkeit der stimulatorischen / inhibitorischen Wirkung [118]. In einer anderen Untersuchung konnte für Flurbiprofen in niedrigen Dosen ein stimulatorischer Effekt, welcher durch Indomethacin zu blocken war, gezeigt werden. In hohen Dosen hatte es einen inhibitorischen Effekt, welcher über die Wirkung der Prostaglandine hinausging (in Anwesenheit von maximal effektiven Konzentrationen von Indomethacin), somit einen anderen Mediatorweg suggerierend [119].

In mehreren Arbeiten wurde die Wirkung der Carboanhydrase (II) als wichtiger Faktor in der Knochenresorption herausgearbeitet [120;121]. Es ist eines der Enzyme, um intrazelluläre Protonen für die Osteoklasten-selektive H^+ -ATPase bereitzustellen und so zusammen mit dem Na/Bicarbonat-Austauscher der basolateralen Zellmembran den neutralen pH-Wert der Zelle aufrechtzuerhalten [122].

Die durch Parathormon und Calcitriol vermittelte Knochenresorption war durch Carboanhydraseinhibitoren, wie Acetazolamid, inhibierbar. Flurbiprofen zeigte zwar eine deutlich geringere Inhibierung boviner und humaner erythrozytärer Carboanhydrase II als Azetazolamid, aber andererseits eine deutlich stärkere Inhibierung als Indomethacin und Ibuprofen. Hier besteht möglicherweise ein weiterer PG-unabhängiger Weg dieser Substanzen. Die genaue Dosis- / Wirkungsbeziehung von Indomethacin am Knochen bleibt somit weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Ein Nachteil von Indomethacin bei systemischer Gabe ist die relativ hohe Inzidenz von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie Übelkeit und Kopfschmerzen etc. [123;124], und mögliche Interaktionen mit der Thromboseprophylaxe durch reversible Inhibition der Plättchenaggregation. Diese könnten durch kontrollierte Freisetzung aus dem Implantat auch unter Erreichen hoher konstanter lokaler Wirkspiegel umgangen werden.

Dieses Prinzip wäre dann auch auf andere Substanzklassen, wie Antibiotika und Wachstumsfaktoren, übertragbar, deren geringe lokale Verfügbarkeit und damit Wirksamkeit bei systemischer Gabe aus der geringen Vaskularisierung / Durchblutung des bradytrophen Knochens resultiert.

1.3 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung war es, eine neue Gruppe von HA mit einer dem menschlichen HA entsprechenden Kristallgröße, die einen organischen Anteil enthält, in vivo zu untersuchen. Die organische Komponente sollte die Bindung von pharmakologisch aktiven Substanzen ermöglichen, deren gesteuerte Freisetzung eine Steuerbarkeit der Degradationsrate sowie Festigkeit erlauben sollte. Die Einheilung und insbesondere der Abbau sollten autologem Knochen entsprechen und damit eine gerichtete Geweberegeneration durch zumindest partiellen Ersatz des Implantats ermöglichen. Für bessere mechanische Eigenschaften wurde einer Charge der partiell degradierbare Knochenzement HEMA zugesetzt. Da nach Implantation sowie bei partikulärem Zerfall fokale entzündliche Reaktionen um Implantate beobachtet worden waren, sollte eine HA-Charge mit dem antiinflammatorischen Zusatz Indomethacin getestet werden. Als Kontrolle diente ein Organoapatit mit Poly-L-Lysin in der Implantatmatrix. Die Fragestellung lautete: Beeinflusst die organische Komponente die biologische Verträglichkeit? Zeigt sich hinsichtlich der Gewebeantwort eine stärkere knöcherne Inkorporation und verstärkte zelluläre Biodegradation in Abhängigkeit von der organischen Komponente? Verändert sich die Implantatstabilität durch den Zusatz? Ergibt sich ein Vorteil gegenüber mikrokristallinem Hydroxylapatit ohne organischen Zusatz? Sind die Materialien als Knochenersatz für den klinischen Gebrauch geeignet?

1.4 Methodischer Ansatz

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurden 3 verschiedene Organoapatite einer mit Poly-L-Lysin, einer mit Poly-HEMA und einer mit Indomethacin/HEMA/Tyrosin in der Matrix in einem standardisierten Kaninchenmodell mit „critical size“-Defekt in spongiösem Knochen untersucht und die Gewebe- und Materialantwort nach 7, 28 und 84 Tagen makroskopisch, mikroskopisch mittels Lichtmikroskopie, ultrastrukturell mittels

Elektronenmikroskopie und molekular mittels In-situ-Hybridisierung qualitativ und quantitativ ausgewertet.