

# 1 Einleitung

## 1.1 Wandel der Krankheiten

Zu Anfang des 20. Jahrhunderts waren Orthopäden vor allem mit angeborenen und durch Krankheit erworbenen Mißbildungen wie z. B. Hüftgelenkluxationen und Tuberkulose der Wirbelsäule konfrontiert. Im Laufe der Zeit hat sich das Spektrum orthopädischer Erkrankungen in den Industrieländern stark gewandelt. Heute stehen überwiegend degenerative Leiden im Vordergrund.

Viele Krankheiten können aufgrund des wissenschaftlichen Fortschritts in der Medizin heute früher diagnostiziert und besser therapiert werden als noch vor einigen Jahrzehnten. Immer größere Bedeutung erlangen Erkrankungen des Bewegungs- und Stützapparates, die mit zunehmender Häufigkeit im höheren Lebensalter auftreten.

Im Hinblick auf den demographischen Wandel unserer Gesellschaft hat deshalb die WHO im Jahre 2000 die „Bone and Joint Decade“ ausgerufen.

## 1.2 Arthrose

Arthrose, eine Erkrankung mit irreversiblen Knorpelschaden, ist die häufigste Ursache einer Behinderung der älteren Bevölkerung 24. Kennzeichnend für dieses Krankheitsbild ist der langsame progrediente Verlauf über Jahre. Im symptomatischen Stadium kommt es zur Entzündungsreaktion der Gelenkinnenhaut mit Ergußbildung der betroffenen Gelenk 56. Im späten Stadium der Krankheit kommt eine zunehmende schmerzhafte Einschränkung der Beweglichkeit hinzu, welche hauptsächlich von der Reaktion des subchondralen Knochens abzuhängen scheint.

Mit zunehmendem Verlust des Gelenkknorpels kommt es zum radiologisch nachweisbaren charakteristischen Bild der Arthrose. Diese Veränderungen sind zum Teil auf die Fähigkeit des Knochens zurückzuführen, auf veränderte mechanische Belastungen durch einen Umbau der Knochenstruktur zu reagieren 114. Allgemein wird die Arthrose als eine Krankheit betrachtet, bei der es primär zu einer Knorpelschädigung im Gelenk kommt und sich sekundär erst knöcherne Veränderungen zeigen. Jedoch sind bereits im Frühstadium einer Osteoarthrose (OA) subchondral Knochenauf- und abbauvorgänge wie verdickte Trabekel zu finden 64, 92. Durch die überwiegenden hypertrophen Umbauvorgänge des Knochens, an denen zahlreiche Substanzen beteiligt sind, ändert sich die Dichte und Struktur des betroffenen Knochens. Hieraus resultieren veränderte biomechanische Eigenschaften. Durch die verminderte Elastizität des subchondralen Knochens wird seine Fähigkeit, Erschütterung zu absorbieren, herabgesetzt, wodurch der darüber liegende Gelenkknorpel einer größeren Belastung ausgesetzt ist 22, 23.

### 1.3 Das Kniegelenk

Das Kniegelenk wird beim Gehen mit dem zwei- bis vierfachen des Körpergewichts belastet 77. Hierbei haben der Gelenkknorpel und der darunterliegende subchondrale Knochen große Bedeutung. Tierexperimentell konnte gezeigt werden dass circa 9% der einwirkenden Spannungsspitzen durch den hyalinen Gelenkknorpel absorbiert werden. Die Reduktion insbesondere von Belastungsspitzen erfolgt so zum einen durch die umgebenden Muskeln und Weichteile, zum anderen durch den subchondralen Knochen 92.

Durch den intakten hyalinen Knorpel wird die reibungslose Gelenkfunktion gewährleistet und die hohen einwirkenden Kräfte bei Belastung abgedämpft.

### 1.4 Die Arthrose des Kniegelenkes

Die Gonarthrose ist die häufigste Arthrose beim Menschen. Die Häufigkeit degenerativer Veränderungen am Kniegelenk hat während der letzten Jahrzehnte zugenommen. Ursachen dafür sind u.a. eine höhere Lebenserwartung und Überlastung durch Übergewicht. Bereits im 50. Lebensjahr zeigt die Hälfte der Bevölkerung Arthrosezeichen am Kniegelenk.

Neben den primären Gonarthrosen mit unbekannter Ätiologie, bei denen Risikofaktoren wie Alter, weibliches Geschlecht und genetische Prädisposition eine Rolle zu spielen scheinen, gibt es eine Reihe von präarthrotischen Veränderungen wie z.B. Übergewicht, Achsendeformität und posttraumatische Alterationen.

So zeigten Untersuchungen degenerative Veränderungen und röntgenologische Zeichen einer Gonarthrose bei 46-89% der Patienten nach einer über 10 Jahren zuvor durchgeführten totalen Meniskektomie 3.

Pathophysiologisch ist die Achsenfehlstellung am Verlauf aller Formen der Gonarthrose maßgeblich beteiligt. Die Abnahme der Dicke des degenerierten Knorpels führt zur vermehrten Seitenabweichung der Kniegelenke und einseitiger größerer Beanspruchung. Es entsteht somit ein Circulus vitiosus, welcher unter konservativer Therapie nicht rückgängig gemacht werden kann. Die Varus-Gonarthrose ist die häufigste Form.

Die Behandlung der Gonarthrose erfolgt zu Beginn symptomatisch. Unter anderem werden lokal Hyaluronsäure-Derivate und Steroiden intraartikulär appliziert, was oft zu einer vorübergehenden Besserung der Beschwerden führt 27.

Bei einigen Patienten mit einer Achsabweichung werden knienaehe Osteotomien zur Korrektur von Achsfehlern durchgeführt, um die Progredienz zu verzögern. Weiter führen arthroskopische Eingriffe im fortgeschrittenen Stadium gelegentlich zu einer wenn auch nur vorübergehenden Besserung der Beschwerdesymptomatik, wobei der Nutzen der arthroskopischen Lavage fraglich blieb 78.

Im Endstadium der Erkrankung kommen operative Eingriffe in Form einer endoprothetischem Versorgung zum Einsatz. Eine Arthrodesen am Kniegelenk ist heute nur noch selten indiziert.

## 1.5 Der Knochen

Folgende Zellen sind am Knochenstoffwechsel beteiligt:

**Osteoblasten** synthetisieren die organischen Bestandteile des Knochengewebes. Anschließend kommt es über ein längeren zeitlichen Verlauf zur Mineralisation der Matrix 113.

**Osteozyten** dienen der Ernährung des Knochens und kommunizieren untereinander mit den Blut- und Lymphgefäßen durch kleine Kanälchen über Zytoplasmafortsätze 69, 104.

Die multinukleären **Osteoklasten** können über die Veränderung des pH-Werts und Bildung von Kollagenasen und lysosomalen Proteasen zur Resorption des Knochens führen.

Die extrazelluläre Grundsubstanz setzt sich aus Mineralien und aus organischen Verbindungen, wie Kollagen zusammen, der Rest ist Wasser.

Jede Veränderung der Knochenstruktur läuft nach der Skelettreifung grundsätzlich als Aufbau oder Abbau des Knochengewebes ab. Durch das Zusammenwirken dieser beiden Vorgänge kann der Knochen auf sich ändernde mechanische Belastungen reagieren. Dieser Prozeß wird als „remodeling“ bezeichnet.

Das Skelettsystem hat neben seiner Funktion als Stützorgan auch eine Speicherfunktion. Um die Aufgaben erfüllen zu können ist der Stoffwechsel des Knochens ein komplexes System, in das Substanzen eingreifen, welche endokrin, parakrin oder autokrin wirken.

Eine Reihe endokriner Substanzen (Wachstumshormone, Sexualhormone, Glucocorticoide, Parathormone, Calcitonin, Vitamin D) und Zytokine sind identifiziert worden, die in die Regulation der Mineralisation und der Strukturierung des Knochens eingreifen. Sie wirken zum einen direkt auf die Zielzellen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden und so eine Signalweiterleitung stattfindet. Aber sie nehmen auch indirekt Einfluß, indem sie ihre Wirkung gegenseitig beeinflussen.

Zusätzlich ist die Wirkung der Hormone und Zytokine von Trägerproteinen abhängig, an die sie zu einem großen Teil gebunden sind. So ändert sich durch die Konzentration und Art dieser Proteine die Verfügbarkeit und zelluläre Bindungseigenschaften der lokalen und systemischen Botenstoffe.

## 1.6 Wachstumsfaktoren

Als Wachstumsfaktoren werden diejenigen Gewebeshormone benannt, welche durch Bindung an spezifischen Rezeptoren die Matrixsynthese, die Zellproliferation und –differenzierung fördern. Diese Substanzen kommen im ganzen Körper vor.

Am Knochen sind sie unter anderem beim Wachstum und an Reparationsvorgängen beteiligt, indem sie auf den Osteoklasten- und Osteoblastenmetabolismus regulierend einwirken.

### **Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind folgende Proteine:**

- Insulin-like Growth Factors ( IGF-1, IGF-2)
- Transforming Growth Factors  $\beta$  (TGF $\beta$ -1 bis TGF $\beta$ -5)
- die Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)
- Platelet Derived Growth Factor (PDGF )
- Fibroblast Growth Factor (FGF )

#### 1.6.1 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)

Von den Insulin-like growth factors kennt man zwei Formen: IGF-1 und IGF-2.

Die IGFs werden als Antwort zum einen auf das Wachstumshormon GH aus der Leber ins Blut freigesetzt und haben somit systemische Bedeutung. Zum anderen werden sie in verschiedenen Geweben neu exprimiert und wirken dort auto- bzw. parakrin 34, 50.

Neben dem Wachstumshormon wirken einige weitere Hormone wie Parathormon und das Vitamin D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) im Knochengewebe stimulierend auf die Neubildung von IGFs 43, 67, 97.

Die IGFs sind zum größten Teil mit Bindungsproteinen (IGFBP) assoziiert. Sie werden dadurch vor Proteasen geschützt und ihre Halbwertszeit im Plasma verlängert sich deutlich 8.

IGF-1, welches aus 70 Aminosäuren besteht, gehört wie Insulin zur Klasse der Peptidhormone 55.

Es vermittelt seine Wirkung auf verschiedene Zellarten über spezielle Rezeptoren. Zwei Klassen dieser Insulin-like-growth-factor-receptors (IGF-R), welche Ähnlichkeit zu den Insulin-Rezeptoren haben, sind bekannt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Aufbaus und Bindungsstärke zu ihren Liganden.

Der Typ 1 Rezeptor, welcher das Signal in das Zellinnere weiterleitet, ist ein tetrameres Glykoprotein, welches aus jeweils zwei extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei transmembranöse  $\beta$ -Untereinheiten besteht. Die Affinität des Rezeptors ist für IGF-1 um das 2-10 fache höher als für IGF-2.

Der Typ 2 Rezeptor besteht aus einer einzigen Polypeptidkette. Im Vergleich zum Typ 1 Rezeptor bindet er IGF-1 mit verminderter Affinität.

Beide Rezeptoren konnten an Knochenzellen nachgewiesen werden. Untersuchungen lassen vermuten, dass der IGF-Rezeptor 1 von deutlich größerer Bedeutung für die IGF Wirkung ist als der IGF-R 2 33.

Für die IGFs wurde nachgewiesen, dass sie beim oben erwähnten Remodelling eine wichtige Rolle beim Knochenaufbau spielen, indem sie auf verschiedenen Stufen des Zellmetabolismus modulierend eingreifen.

So konnte in mehreren Studien mit unterschiedlichen Versuchsmodellen für die IGFs gezeigt werden, dass sie auf die Zellproliferation und die Kollagen-1 Synthese der Osteoblasten stimulierend wirken und ihre Zelldifferenzierung fördern 75, 97, 37, 79, 21.

Wurde die endogene IGF Aktivität durch IGF-Antikörper oder Antikörper gegen IGF-Rezeptoren reduziert, nahm die Proliferations- und Syntheserate der Osteoblasten ab 4, 74, 75.

In den Wachstumsfugen, im Periost des wachsenden Knochens und im Kallusgewebe nach einer Fraktur ist die IGF Expression relativ hoch, was auf die Beteiligung des IGF bei der Knochenneubildung und Knochenheilung schließen lässt 88, 5, 42. Auch gibt es Hinweise, dass IGF bei der Reaktion des Knochens auf eine höhere mechanische Belastung involviert ist 89.

Neben den anabolen Effekten hemmen die IGFs katabole Vorgänge im Knochengewebe. So wurde von Canalis die verminderte Kollagenase Expression durch die IGFs beschrieben 20. Neu synthetisiertes IGF wirkt hauptsächlich direkt auf die Knochenzellen. Jedoch wird auch ein Teil in die Knochenmatrix eingebaut. Dies wird während eines späteren Resorptionsvorgangs aus dem Knochen freigesetzt, wodurch es dann erst stimulierend in das Remodelling eingreift 50, 37, 74.

### 1.6.2 Insulin-Growth-Factor-Binding-Proteins (IGFBP)

Die Bioaktivität der IGFs wird auf verschiedenen Ebenen des Zellmetabolismus geregelt, wobei die extrazelluläre Modulation durch die Trägerproteine IGFBPs großen Einfluß auf die Interaktion zwischen IGF und ihrem Rezeptor zu nehmen scheint 59.

Die Höhe der systemischen und lokalen Konzentration der IGFBPs hängt von zahlreichen endokrinen Faktoren ab. So wurde für einige Hormone, wie z.B. Wachstumshormone, Glucocorticoide oder Vitamin D eine regulierende Wirkung auf die Konzentration der IGFBPs beschrieben 20, 29, 99.

Weiter wird die lokale Verfügbarkeit aber auch wesentlich über den Abbau der IGFBPs durch Proteasen mitbestimmt 30, 63.

Bisher sind sieben dieser Insulin-like growth factor Bindungsproteine identifiziert worden, die von verschiedenen Geweben freigesetzt werden und mit IGFBP-1 bis IGFBP-7 bezeichnet wurden 113, 103. Sie haben bestimmte strukturelle und funktionelle Eigenschaften gemeinsam. Die Proteine bestehen aus drei strukturellen Bereichen mit weitgehender Homologie der Aminosäuresequenz und binden IGF-1 und IGF-2 mit hoher Affinität 9.

Auch wenn es Ausnahmen gibt, verhindert die Interaktion zwischen IGFBP und IGF-1 oder IGF-2 die Aktivierung des Rezeptors an der Zelloberfläche. Beispiele für diese hemmende Wirkung der IGFBP auf die Signalüber-

tragung der IGFs gibt es auf allen Ebenen von der DNA-Synthese in der Zelle über die Blutzuckerregulation bis hin zur Beeinflussung der Körpergröße 6, 28, 32, 36, 54, 57, 66.

Für die im Blut zirkulierenden IGFs wird als Hauptsyntheseort die Leber angenommen 101. Osteoblasten können zumindest die ersten sechs IGFs synthetisieren 51. Insbesondere die IGFBP3-5 dürften als wichtige Faktoren in den Metabolismus des Knochengewebes eingreifen 20.

Das aktive IGFBP-3 besteht aus 264 Aminosäuren. Zumindest im Blut bindet es neben IGF-1 und IGF-2 noch eine säurelabile Untereinheit und liegt in Form eines ternären Komplexes vor 10.

Die wesentliche Funktion der IGFs ist die Bereitstellung eines IGF-Reservoirs mit Pufferfunktion. Zusätzlich wird durch Bindung der IGFs die Interaktion von IGFs mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche verhindert und ihre biologische Aktivität herabgesetzt 109.

IGFBP-3 werden sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte *in vitro* zugeschrieben, was von einer Reihe von Faktoren wie Art der Zellkulturen oder Konzentration abzuhängen scheint. In mehrere Versuchsreihen mit Zellkulturen konnte sowohl eine Potenzierung der IGF Aktivität durch IGFBP-3 als auch eine Hemmung auf das Zellwachstum beobachtet werden 36, 43, 31, 76.

In den letzten Jahren lassen verschiedene Studien erkennen, dass IGFBP-3 auch unabhängig vom IGF-IGF-Rezeptor-Systems den Zellmetabolismus beeinflusst 59, 68.

### 1.6.3 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ )

Eine weitere Substanz, welche zu den Wachstumsfaktoren zählt und im Jahre 1983 erstmals beschrieben wurde, ist TGF- $\beta$ . Sie zählt zu der Klasse der TGF- $\beta$  Superfamilie, einer großen Gruppe von Faktoren und Zytokinen, zu der nicht nur die verschiedenen TGF- $\beta$  Isoformen gehören, sondern auch die BMPs, Aktivine und zahlreiche andere Wachstumsfaktoren.

Die TGF $\beta$ s regulieren sowohl das Wachstum als auch die Differenzierung vieler unterschiedlicher Zelltypen einschließlich der Osteoblasten 95, 19, 25, 107. Sie werden von den meisten Zelltypen synthetisiert und können autokrin, parakrin oder auch endokrin auf Zellen wirken. TGF $\beta$ -1 und TGF $\beta$ -2 werden von den Osteoblasten synthetisiert und im Knochengewebe deponiert 39, 40.

Wenigstens fünf verschiedene Subtypen sind aus der TGF- $\beta$  Familie bekannt und werden mit TGF- $\beta$ 1 bis TGF- $\beta$ 5 durchnummeriert.

Verschiedene Faktoren nehmen Einfluß auf die Regulierung der Synthese von TGF $\beta$ -1, wobei hier viele Fragen noch offen sind. *In vitro* konnte gezeigt werden dass Hormone wie Vitamin D, Oestrogen, Testosteron oder PTH sowie lokale Zytokine die TGF $\beta$  –Synthese stimulieren 35, 118. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend führte bei Ratten ein Vitamin D und Östrogen Mangel zu einer verminderten TGF $\beta$ -1 Konzentration im Knochen 25, 45, 74, 44, 12, 83.

Sie werden als inaktive Vorläuferproteine sezerniert und erst nach Proteolyse des am carboxyterminalen Ende latent-assoziierten Proteins (LAP), welche durch Proteasen oder durch einen sehr niedrigen pH-Wert hervorgerufen wird, gehen sie in die aktive Form über 25, 35, 73. LAPs könnten somit durch Assoziation mit dem aktiven Komplex als ein natürlicher Antagonist fungieren und so den aktivierten in einen inaktiven Zustand überführen .

Das menschliche TGF- $\beta$ 1 ist ein Homodimer mit einer Größe von 25kDa 2.

So wie die meisten Polypeptidhormone bindet TGF $\beta$ -1 an spezifischen Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzelle und vermittelt so die biologische Wirksamkeit. Die Signalübermittlung findet bei TGF $\beta$ -1 und den anderen zu dieser Gruppe gehörenden Substanzen durch die Bindung an einen Proteinkomplex statt, welcher aus zwei verschiedenen Rezeptoren besteht 26. Die Untersuchungen von Wrana et. al. 115 legen die Vermutung nahe, dass die Bindung an beide Rezeptoren nötig ist, um so die Signalüberleitung zu gewährleisten.

Aus mehreren Studien hinsichtlich der Funktion der TGF $\beta$ s lässt sich ableiten, dass sie eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum und Remodelling spielen dürften. TGF $\beta$ s sind reichlich im Knochen vorhanden, wobei die höchste Konzentration aus dieser Gruppe das TGF $\beta$ -1 hat 106. In in vitro Untersuchungen ließen sich für TGF $\beta$ -1 sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von knochenbildenden Zellen nachweisen abhängig von den verwendeten Zellkulturen und weiteren Parametern 25, 58, 108, 112. Die lokale und systemische Gabe von TGF $\beta$ -1 in vivo zeigte vielfach eine osteoinduktive Wirkung mit vermehrter Knochenbildung und Zunahme der Knochendichte 11, 60, 82, 98. Mechanische Belastung führte zu höheren Konzentrationen von TGF $\beta$ -1 61. Insgesamt ist für TGF $\beta$ -1 ein anaboler Effekt auf den Knochen zu vermuten.

## 1.7 Fragestellung

Erst in den letzten Jahren rückten die subchondralen Veränderungen des Knochens mehr und mehr ins Blickfeld als Ausgangspunkt der Arthrose. Zwar sind die hypertrophen Umbauvorgänge des Knochens bei Arthrose seit längerem bekannt, jedoch sind die zugrunde liegenden Zusammenhänge bis heute noch wenig verstanden. Es gibt eine Reihe von in vitro Untersuchungen mit knochenbildenden Zellkulturen deren biochemischen Ergebnisse sich zum Teil widersprechen und deren Übertragbarkeit auf den lebenden Organismus fraglich ist 21, 75, 120, 25. Daten über die Rolle der Gewebeshormone im subchondralen Knochen bei finden sich in der Literatur nur vereinzelt 70, 53.

### **Folgende Fragestellungen liegen dieser Arbeit zugrunde:**

Sind die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF $\beta$ 1 sowie das IGFBP-3 im subchondralen Knochen bei Arthrose verändert?

Lässt sich eine Beziehung zur Belastung und zum Achsfehler herstellen?