

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss lokaler Applikation von Bisphosphonaten
(Zoledronat) auf die Frakturheilung

- Eine biomechanische Studie am Rattenmodell -

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

David Alexander Back

aus Schweinfurt

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schmidmaier
2. Prof. Dr. Ch. J. Strasburger
3. Prof. Dr. med. M. J. Raschke

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

1. Einleitung	5
1.1. Einführung	5
1.2. Aspekte der Frakturheilung	6
1.3. Zoledronat - ein Bisphosphonat	8
1.4. Applikationsform.....	11
1.5. Vorarbeiten zum Projekt.....	13
1.6. Experimentaufbau	14
1.7. Arbeitshypothese.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Versuchstiermodell.....	15
2.2. Implantate	16
2.3. Frakturmodell und Frakturmaschine.....	17
2.4. Anästhesie	18
2.5. Operation	19
2.6. Kontrollparameter-Untersuchungen	21
2.7. Röntgen.....	22
2.8. Nachsorge.....	23
2.9. Tötung und Implantatentfernung	23
2.10. Biomechanische Testung	25
2.10.1. Material	25
2.10.2. Die Torsionsmaschine.....	26
2.10.3. Einbettung der Tibiae	27
2.10.4. Die torsionale Testung	28
2.10.5. Auswertung der Daten	29
2.11. Reliabilität der Torsionsmaschine.....	30
2.12. Radiologische Auswertung.....	30
2.13. Statistik.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Ergebnisse der Kontrollparameter-Überwachung.....	32
3.2. Radiologische Frakturklassifikation	33
3.3. Kalluskonsolidierung	34
3.4. Mittlere Kallusfläche	36
3.5. Polares Flächenträgheitsmoment.....	36

3.6. Makroskopische Begutachtung	37
3.7. Reliabilität der biomechanischen Ergebnisse	37
3.8. Biomechanische Auswertung	38
3.8.1. Maximales Drehmoment nach 42 Tagen Standzeit.....	38
3.8.2. Maximale torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen Standzeit	39
3.8.3. Maximales Drehmoment nach 84 Tagen Standzeit.....	40
3.8.4. Maximale torsionale Steifigkeit nach 84 Tagen Standzeit	41
3.8.5. Gegenüberstellung der Ergebnisse des maximalen Drehmoments	42
3.8.6. Gegenüberstellung der Ergebnisse der max. torsionalen Steifigkeit ...	43
3.9. Biomechanik-Kallusfläche-Korrelation.....	44
4. Diskussion	45
4.1. Diskussion der Ergebnisse.....	45
4.2. Diskussion von Material und Methoden.....	50
4.3. Klinische Relevanz und Ausblick.....	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Abbildungsverzeichnis.....	65
8. Tabellenverzeichnis.....	66
9. Abkürzungsverzeichnis.....	67
10. Danksagung	68
11. Publikationen und Vorträge.....	69
12. Lebenslauf	70
13. Eidesstattliche Erklärung	72

1. Einleitung

1.1. Einführung

Weltweit werden durch Verkehrsunfälle jährlich ca. 800.000 Menschen getötet und mehr als 10-15 Millionen verletzt oder dauerhaft geschädigt. Nach einer Studie der Harvard School of Public Health und der WHO (⁵²) werden Unfälle und ihre Folgen bis 2020 in der Kausalität für Tod und Behinderung international vom derzeit 9. auf den 3. Platz vorrücken – dann nur noch übertroffen durch die Auswirkungen von Herzkrankheiten und der unipolaren Depression.

Bei Unfällen kommt es häufig zu Frakturen im Bereich der unteren Extremitäten. Patienten sind dabei oft jung und die medizinischen und sozioökonomischen Kosten des Heilungsprozesses entsprechend hoch (^{10;25}). Das momentane Risiko, im Leben eine Fraktur zu erleiden, beträgt bei Männern 1:2 und bei Frauen 1:3. Diese Zahlen sind bereits heute äquivalent zu dem Risiko, an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken und machen deutlich, dass Frakturen ein ernst zu nehmendes gesellschaftliches Problem darstellen (¹⁶). Die Häufigkeit des Auftretens von Frakturen und eines beeinträchtigten Heilungsverlaufes sind darüber hinaus gekoppelt mit den demographischen Verschiebungen innerhalb unserer Gesellschaft, wie dem zunehmenden Anteil älterer Menschen in der Gesellschaft (⁶¹).

Unter anderem vor dem Hintergrund solcher Erkenntnisse wurde das Jahrzehnt von 2000 - 2010 international mit Unterstützung der WHO zur „Bone and Joint Decade“ erklärt (³⁴), zu deren Kernpunkten auch die Behandlung von Traumata und die weitere Erforschung ihrer suffizienten Therapie gehören.

Die adäquate Versorgung von Frakturen bleibt in der muskuloskeletalen Chirurgie eine Herausforderung. Die wichtigsten Punkte für eine erfolgreiche Knochenheilung sind die Wiederherstellung biomechanischer Stabilität und die Erhaltung der Vitalität des Knochens. Zusätzlich sollte auch die Vermeidung von Durchblutungsproblemen, mechanischer Instabilität, Infektionen und systemischer Krankheiten das chirurgische Vorgehen leiten. Trotz vieler Fortschritte und neuer Therapiekonzepte in der Unfallchirurgie und dem Nutzen von unterschiedlichen Osteosynthesematerialien zur mechanischen Frakturstabilisierung kommt es dennoch in ca. 5-10 % der Fälle zu einer Verzögerung der Frakturheilung und auch zu Pseudarthrosen (⁶⁵).

Der Einsatz von Medikamenten, die die Knochenheilung fördern, könnte hierbei zu einer zusätzlichen Verbesserung und Beschleunigung des Behandlungsverlaufes führen. Damit einhergehend würde auch die Anzahl der Komplikationen verringert werden. Dies und eine schnellere Heilung könnten in kürzeren Krankenhausaufenthalten resultieren, was auch die Risiken des einzelnen Patienten senken würde, durch lange Liegezeiten postoperative Infektionen, Pneumonien oder tiefe Beinvenenthrombosen mit konsekutiven Lungenembolien (Letalität 5%) zu erleiden.

1.2. Aspekte der Frakturheilung

Nach einer Fraktur kommt es zu einem Verlust der Kontinuität und Integrität des Knochens. Während der darauf folgenden Heilungs- und Konsolidierungsphase erfolgt bei Röhrenknochen die Überbrückung des Defektbereichs, die Wiederherstellung der Markhöhle und der vollen Belastungsfähigkeit des Knochens. Es können zwei Arten der Frakturheilung unterschieden werden (⁷³).

Bei der *primären Frakturheilung* kommt es unter rigider Fixierung durch Osteosynthesematerialien und engem Anliegen der Knochenfragmente ohne externe Kallusbildung zu einer Heilung durch direkte Union. Hierbei formen Osteoklasten (OKen) „Cutting Cones“ über die Bruchstelle hinweg, gefolgt von Osteoblasten (OBen), die die Kanäle mit Knochensubstanz füllen.

Bei der *sekundären Frakturheilung* lassen sich folgende Schritte abgrenzen:

1. Phase (1.-6. Tag): Auftreten eines Hämatoms zwischen den Bruchenden.
2. Phase (6.-12.Tag): In den Bruchspalt wächst aus den eröffneten Markräumen und vom Periost her Granulationsgewebe ein, dem sich Osteoklasten und Osteoblasten durch Chemotaxis anschließen. Das Hämatom wird resorbiert und neue Knochensubstanz gebildet.
3. Phase (12.-21. Tag): Bildung von Osteoidgewebe, das in unregelmäßig angeordneten Geflechtknochen übergeht. Es kann auch hyalines Knorpelgewebe entstehen, welches dann ebenfalls durch Knochen ersetzt wird.
4. Phase (ab 4. Woche): Verknöcherung durch Mineralisation des osteoiden Gewebes. Knöcherner Kallus entsteht im Überschuss, so

dass die Fraktur auf Periostseite und zwischen den Bruchenden von einem mächtigen Geflechtknochen überbrückt wird, der die Frakturrenden einmauert und verbindet.

Auf zellulärer Ebene bestehen ständige Wechselwirkungen zwischen Osteoklasten und Osteoblasten ⁽²⁸⁾. Hierbei spielen zwei Proteine der Osteoblasten eine Rolle: Das sezernierte *Osteoprotegerin* (OPG) und der an der Zelloberfläche exprimierte *Receptor Activator for Nuclear Factor- κ B Ligand* (RANKL), die beide auf die Differenzierung von Osteoklasten wirken ^(42;43). Dabei fördert RANKL die Osteoklastogenese durch die Bindung an das Protein RANK (*Receptor Activator for Nuclear Factor- κ B*) in der Zellmembran von Osteoklasten. OPG wiederum ist in der Lage, diese Interaktion durch Bindung an RANKL zu verhindern ⁽³²⁾ (s. Abb. 1).

Demnach ist die Balance zwischen RANKL und seinem Inhibitor OPG ⁽³¹⁾ und die damit verbundene Hemmung oder Förderung der OK-Aktivität eine der vielen Komponenten, die das Ausmaß an Knochenresorption regulieren.

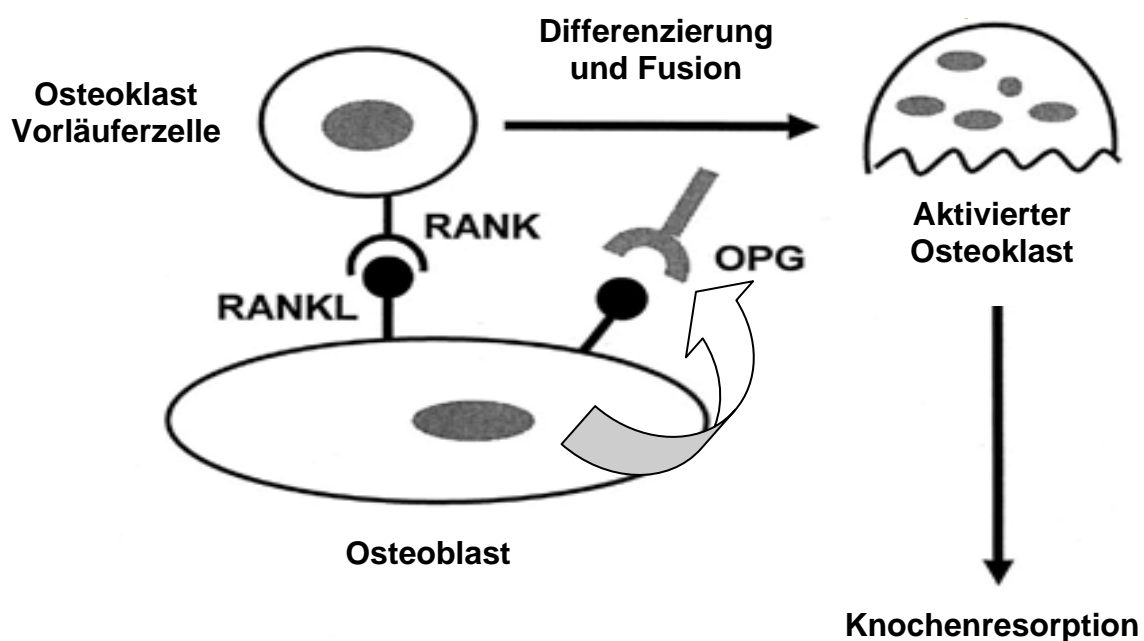


Abb. 1: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten auf zellulärer Ebene

Diese Mechanismen der Knochenreparatur stellen eine komplexe Kaskade biologischer Ereignisse dar, deren Störung zu einer verzögerten Heilung oder der Ausbildung von Pseudarthrosen führen kann.

Da herkömmliche Implantate allein in bestimmten Fällen nicht zur Sicherstellung der Knochenheilung ausreichen, wäre eine Ergänzung mit Substanzen sinnvoll, die ihren Nutzen bei der Verbesserung und Förderung des

Knochenmetabolismus bereits erwiesen haben. Klinisch erprobte Medikamente, die den Knochenstoffwechsel systemisch beeinflussen, könnten auch bei der Behandlung von Knochenbrüchen effektiv sein.

1.3. Zoledronat - ein Bisphosphonat

Die ersten Bisphosphonate (BP) wurden bereits im 19. Jahrhundert synthetisiert⁽⁵¹⁾, aber anfangs hauptsächlich in der Textil-, Dünger- und Ölindustrie eingesetzt⁽⁷⁾. Ihr Potential zur Behandlung von Krankheiten des Mineralstoffwechsels wurde erst in den 1960ern deutlich. Heutzutage sind BP die wichtigste Klasse von antiresorptiven Substanzen, die in der Behandlung von Knochenerkrankungen⁽⁶⁸⁾ eingesetzt werden, wie der Tumor assoziierten Osteolyse, der Hyperkalzämie bei Malignität⁽¹⁹⁾, dem Morbus Paget des Knochens⁽¹¹⁾ und der Osteoporose⁽⁷⁰⁾. Dabei führt v.a. eine BP-induzierte Störung der Osteoklasten zur Inhibition der Resorption und Abnahme des Knochenumbaus⁽¹²⁾. Die klassische BP-Therapie ist die systemische Applikation durch orale oder i.v. Gabe, wobei allerdings eine niedrige Bioverfügbarkeit⁽³³⁾ sowie Nebenwirkungen wie Fieber^(53,86), Magengeschwüre⁽¹⁷⁾, Osteonekrosen der Mandibula⁽³⁰⁾ u.a. (s. auch S.11) beobachtet wurden.

BP sind metabolisch stabile synthetische Analoga des natürlich auftretenden inorganischen Pyrophosphat (PPi) (Abb. 1a), in denen das Sauerstoffatom der relativ instabilen *P-O-P* Bindung durch ein Kohlenstoffatom ersetzt worden ist. Dies führt zu einer metabolisch stabilen *P-C-P* Struktur, in der die zwei P-Gruppen durch nicht hydrolysierbare Phosphorether-Bindungen an das zentrale C-Atom gebunden sind⁽¹³⁾ (Abb. 1b). Dadurch sind BP resistent gegen Hydrolyse unter Säureeinfluss⁽⁷⁰⁾, wie sie in den Lakunen der Osteoklasten (Osteoklasten) vorkommen.

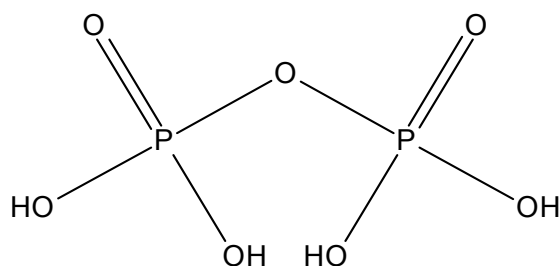


Abb.2a: Inorganisches Pyrophosphat

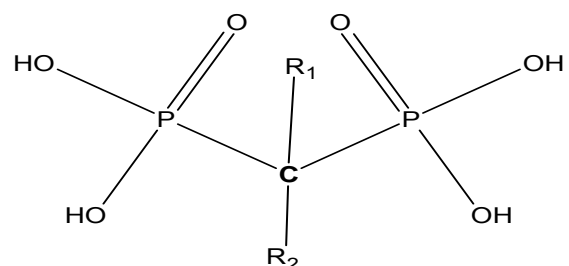


Abb. 2b: Grundstruktur Bisphosphonate

BP

sind kleiner als 300 Dalton und formen eine dreidimensionale Struktur, die in der Lage ist, ein divalentes Metall-Ion wie Ca^{2+} mit den P-Gruppen zu binden⁽⁷⁰⁾.

Entscheidend aber ist, dass der Tausch des O-Atoms gegen ein C-Atom die Möglichkeit eröffnet, zwei Seitenketten in der Position R_1 und R_2 anzuhängen. Durch eine OH-Gruppe an R_1 kann die hohe Affinität zu Ca^{2+} weiter gesteigert werden (^{39;69}). Die dadurch bedingte Bindungsfähigkeit an Knochen führt zu einer rapiden Clearance der BP aus der Zirkulation und einer selektiven Lokalisation an der Knochenoberfläche und Stellen aktiven Knochenumbaus (⁴⁸). Hierdurch wird die Effektivität von BP noch potenziert, weil dies an Umbaustellen zu einer hohen lokalen Konzentration führt (^{12;18;18}). Kommt es dann zur Resorption des Knochens, werden die gebundenen BP freigesetzt, da bei saurem pH die Bindungsfähigkeit von BP an Ca^{2+} reduziert ist. Die Osteoklasten werden damit zusätzlich einer lokal hohen Konzentration ausgesetzt (¹⁵).

Die Wirksamkeit von BP hängen von zwei Struktureigenschaften ab (^{71;89}):

Die Knochenaffinität wird bestimmt durch die beiden P-Gruppen und die Hydroxy-Gruppe in R_1 , die biologische Aktivität und die Wirkungspotenz durch die Art des R_2 .

- Die BP der 1. Generation (klinisch verwendet seit 1970/80) hatten entweder ein einzelnes Atom oder eine einfache Alkyl-Kette an Position R_2 und waren relativ schwache Inhibitoren der Knochenresorption mit geringer Potenz und kleinem therapeutischem Resorptionsfenster (z.B. Clodronat und Etidronat).
- Die BP der 2. Generation hatten bereits erhöhte antiresorptive Eigenschaften, ein weiteres therapeutisches Fenster bei vielen indizierten Erkrankungen und erstmals eine basische Amino-Alkyl-Gruppe an R_2 (z.B. Pamidronat, Alendronat, Risendronat, Ibandronat, Incadronat).
- Die BP der 3. Generation, die die bislang potenteste Wirkung zeigten, enthielten schließlich heterozyklische Ringe mit einem oder mehreren Stickstoff(N)-Atomen (N-BP, z.B. Zoledronat).

Da in verschiedenen Studien nicht alle BP die gleichen Effekte auf Osteoklasten zeigten (³⁷), warf dies die Frage nach einem möglichen strukturabhängigen Aktionsmechanismus auf. Man fand heraus, dass sich BP nach ihrer molekularen Wirkungsweise in zwei Gruppen einteilen lassen.

- 1) Die einfachen (PPi nahen) BP (z.B. Clodronat) werden intrazellulär in ATP-Analoga metabolisiert, wobei die nicht hydrolysierbare *P-C-P* Gruppe der BP das *P-O-P* im ATP ersetzt (²¹). Diese Metaboliten sammeln sich im Zytosol

von Osteoklasten an und induzieren die Apoptose ⁽²¹⁾, wahrscheinlich durch Behinderung von ATP-abhängigen Enzymen, was u.a. zur Störung des mitochondrialen Membranpotentials und Freisetzung von Cytochrom C führt ⁽⁶⁹⁾.

- 2) Die potenteren N-BP mit den sperrigeren Seitenketten werden nicht metabolisiert. Charakteristisch für sie ist ein Stickstoff-Anteil in einer Alkyl-Kette (z.B. Alendronat) oder einer heterozyklischen Struktur (z.B. Zoledronat). Sie agieren durch Inhibition der *Farnesyl Diphosphat Synthetase* (FPPS), ein Schlüsselenzym des Mevalonat-Stoffwechselweges. Dadurch unterbleibt die Aktivierung kleiner GTPasen ^(69;70), die sonst als Signal-Proteine eine Vielzahl der für Osteoklasten notwendigen Prozesse an den Zellmembranen regeln ⁽¹³⁾. Es kommt so zur Störung von Zytoskelett und Oberflächenstruktur, intrazellulärem Vesikeltransport und anderen Funktionen der Osteoklasten ^(36;70) und abschließend zu ihrer Inaktivierung und Apoptose.

Mit ihrer Wirkungsweise ist auch die häufigste Nebenwirkung bei i.v. Gabe von N-BP verbunden, eine grippeartige Akute-Phase-Reaktion, die nach Erstapplikation bei etwa einem Drittel der Patienten auftritt. N-BP werden dabei wohl durch hoch endozytotische Zellen wie Monozyten aufgenommen und führen durch Inhibition der FPPS zur intrazellulären Akkumulation von Metaboliten. Diese werden T-Zellen präsentiert, deren Aktivierung die Akute-Phase-Reaktion bedingt ⁽¹³⁾.

Im Gegensatz zu den erwähnten hemmenden Effekten der BP auf Osteoklasten deuten viele experimentelle Ergebnisse auf positive Effekte von BP auf Zellen der Osteoblasten-Linie hin ^(14;63;80;81). So regulieren BP direkt die Differenzierung und Genexpression von Osteoblasten ⁽⁶⁸⁾, stimulieren die Formation von OB-Vorstufen, fördern die frühe Osteoblastogenese ^(12;24;36) und können die OB-Proliferation beeinflussen ^(22;68;88).

Somit lässt sich ein Einfluss von BP auf die Knochenstärke vermuten ⁽⁶³⁾, der nicht nur auf reduzierter Knochenresorption beruht. BP verhindern – anders als bei Osteoklasten – unabhängig von N-Gruppen die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten durch Regulierung von Membrankanälen und zellulären Kinasen ^(62;64). Dies könnte die Annahme begründen, dass ein Teil der osteoprotektiven Wirkung von BP darin liegt, durch das Verhindern der Apoptose einerseits die Integrität des

Osteozyten-Netzwerks zu bewahren und andererseits die Wirkdauer von Osteoblasten zu verlängern⁽⁶⁴⁾.

Es gibt ferner Hinweise, dass ein Teil der antiresorptiven Wirkung von BP direkt durch die Vermittlung von Osteoblasten geschieht. So wurde gezeigt, dass BP die Expression und Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) durch osteoblastäre Zelllinien stimulieren^(28;88) und die Sekretion von RANKL inhibieren⁽²⁸⁾. Dies wiederum würde zu einer Reduktion bei der Differenzierung von Osteoklasten führen.

Unter den heute klinisch verwendeten BP hat sich Zoledronat (ZOL) als BP der dritten Generation mit einem heterozyklischen Ring und zwei N-Atomen als bislang potentester Inhibitor der Farnesyl Diphosphat Synthetase⁽⁴⁰⁾ und damit OK-Hemmer erwiesen⁽⁸⁹⁾. Zoledronat ist nach Herstellerangaben für eine systemische i.v. Applikation zur Behandlung von tumorinduzierter Hyperkalzämie und Skelettmetastasen zugelassen. Ferner wird es im „Off-Label-Use“ wie andere BP beim Morbus Paget des Knochens⁽¹¹⁾ und post-menopausaler Osteoporose⁽⁴⁹⁾ angewendet. Zoledronat ist als erstes BP sowohl bei lytischen als auch blastischen Krankheiten (wie Knochenmetastasen des Prostata-Karzinoms) effizient⁽⁴⁹⁾ und bei gleicher Sicherheit und Nebenwirkungsspektrum wie Pamidronat 2-3 mal potenter⁽⁴⁹⁾. Auch andere Studien bestätigten die höhere Wirksamkeit und Potenz von Zoledronat gegenüber oft genutzten BP wie Pamidronat oder Alendronat^(57;89).

Unter systemischer Gabe sind bei Patienten grippeähnliche Symptome, Fieber, gastrointestinale Beschwerden und leichte Anämien beschrieben worden⁽⁴⁹⁾. Zoledronat kann zu Nierenfunktionsstörungen und deren Progredienz führen. Außerdem wurden in seltenen Fällen schwere Anämien und Thrombozytopenien, Leukopenien oder Panzytopenien beobachtet (Novartis). Um solche Nebenwirkungen zu vermeiden und die Bioverfügbarkeit zu erhöhen, könnte die systemische Gabe durch eine lokale ersetzt werden, z.B. durch Beschichtung eines Implantates mit Zoledronat.

1.4. Applikationsform

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Wirkstoffe zu applizieren – lokal oder systemisch (letzteres z.B. subkutan, intravenös, intramuskulär, oral, sublingual, etc.). Nicht alle systemisch verabreichten Stoffe haben eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit oder

reichern sich am erwünschten Ort an. Deshalb kann durch lokale Applikation eine therapeutische Konzentration an einer genau definierten Stelle realisiert werden.

In verschiedenen Bereichen der Medizin zeichnet sich heute die Tendenz zur Kombination von Implantaten mit Medikamenten ab wie bei der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, Tumoren oder in der muskuloskeletalen Chirurgie⁽⁹³⁾. Die Verwendung solcher Kombinationsmaterialien in der Orthopädie und Unfallchirurgie könnte die funktionelle und strukturelle Komponente von Implantaten um die Möglichkeit der lokalen Applikation von Wirkstoffen ergänzen. Idealerweise wird dabei eine therapeutische Wirkstoffdosis kontinuierlich und über definierbare Zeiträume an der Zielstelle freigesetzt. Dies geschieht meist zweiphasig, wobei auf eine initial hohe Abgabe eine Periode niedriger und verzögerter Freisetzung folgt. Zu den Vorteilen lokaler Freisetzung gehört⁽⁹³⁾, dass

- eine niedrigere Dosis benötigt wird als bei systemischer Gabe,
- eine bessere Kontrolle über Bioverfügbarkeit und Toxizität besteht,
- die Freisetzungsdauer verlängert ist,
- lokale und systemische Freisetzungskinetiken kombiniert werden können,
- eine kontrollierte Freisetzung von Trägern direkt am Wirkort möglich wäre und
- Nebenwirkungen einer systemischen Exposition vermieden werden würden.

Trotzdem müssten auch hierbei Pharmakokinetik, die Freisetzungskinetik vom Träger und eventuelle Nebenwirkungen abgewogen werden.

Bisphosphonate wie Zoledronat wurden ausgiebig untersucht und haben ihren antiresorptiven Effekt bei verschiedenen Anwendungen demonstriert. So wurde eine erhöhte Fusionsrate in Rattenwirbeln erreicht⁽⁹⁾, durch systemische Gabe die Frakturheilung signifikant verbessert^(2;3;26;45-47;55;60) und durch systemische sowie lokale Gabe die knöcherne Implantatintegration gefördert^(6;56;59;85). Es gab auch bereits einige experimentelle Versuche, BP lokal zu applizieren^(6;38;85). Hierbei stand aber in erster Linie die bessere Einheilung von Implantaten, wie Hüftprothesen⁽⁸⁰⁾ oder Schrauben, im Vordergrund. Dabei zeigten die verwendeten BP bei lokaler Applikation meist ein deutlich verbessertes Einwachsen von Implantaten^(58;59), wobei es zu einer Erhöhung der biomechanischen Festigkeit⁽⁸⁵⁾ oder zur Reduktion der Knochenresorption⁽⁶⁾ kam. Bei der Anwendung zum Schutz von Knochentransplantaten reduzierte lokales BP die Resorption und führte zu dichterem trabekulärem Knochen⁽⁸²⁾.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob es nach einer Fraktur durch die lokale Freisetzung von Zoledronat aus einer Implantatbeschichtung zu einer Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften und einer Beschleunigung der Wiederherstellung der Knochenstabilität kommt.

Unter den Biomaterialien und Wirkstoffträgern sind Polylaktide und Polyglykolsäuren bzw. ihre Co-Polymere verbreitet und wurden bereits vielfach experimentell und klinisch eingesetzt (^{27;91}). Auf einen intramedullären Kraftträger aufgetragen, würde Zoledronat lokal durch Diffusion und enzymatischen Abbau des Wirkstoffträgers freigesetzt werden und seine Wirkung entfalten. Für eine biologisch vom Körper vollständig abbaubare Beschichtung für Osteosynthesematerialien wurde ein kaltes Beschichtungsverfahren auf Basis des Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) entwickelt, in welche bioaktive Substanzen eingearbeitet werden können.

1.5. Vorarbeiten zum Projekt

PDLLA ist ein Polymer der Poly- α -Hydroxysäure und wird im Körper vollständig durch enzymatische Hydrolyse zu Monomeren abgebaut, die im Zitratzyklus noch in H_2O und CO_2 zerlegt werden können (⁷⁸).

In Versuchen zeigte sich durch Gewichtsbestimmung und photometrische Analysen, dass beim Auftragen von PDLLA auf Titan- vs. Stahl-Kirschnerdrähte mit einer kalten Beschichtungstechnik die Gesamtbeschichtungsmasse auf den Titandrähten größer war ($1,13 \text{ mg} \pm 0,06$) als auf den Stahldrähten ($0,80 \text{ mg} \pm 0,04$). Bei Implantations- und Explantationsversuchen der mit PDLLA beschichteten Drähte in Rattentibiae zeigten Titanimplantate (2,9%) einen geringeren Verlust der gesamten Beschichtungsmasse gegenüber Stahlimplantaten (4,6%). Bei allen Implantaten wurde eine gleichmäßige Beschichtung durch ein Elektronenmikroskop analysiert.

Greiner et al. untersuchten in in-vitro Versuchen die ZOL-Freisetzung von PDLLA-beschichteten Titan-Kirschnerdrähten auf Osteoklasten und Osteoblasten. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige signifikante Minderung der Neubildung und Aktivität von Osteoklasten. Auf Osteoblasten hatte die Exposition aus PDLLA freigesetzten ZOL-Konzentrationen einen positiven Effekt bei Differenzierung und Protein-Synthese ohne dabei die Proliferation zu beeinflussen (²⁸).

1.6. Experimentaufbau

Die Knochenstabilität wird von einer Vielzahl von Parametern bedingt wie der Knochenarchitektur, der Mineralisation oder der Matrixstruktur. Durch biomechanische Untersuchungen können wichtige Aussagen über den Effekt eines applizierten Wirkstoffs auf Knochen getroffen werden⁽²⁰⁾, weil sie Hinweise auf die mechanische Stabilität und Festigkeit eines Knochens liefern. Dies ist letztlich im Behandlungsergebnis einer Fraktur von hohem Interesse ist.

Zur Imitation eines möglichst realistischen Unfallhergangs wurde ein Frakturmodell etabliert, bei dem zuerst die Setzung einer standardisierten geschlossenen Fraktur mit anschließender intramedullärer Stabilisation erfolgte⁽⁷⁴⁾.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der lokalen Freisetzung des Bisphosphonat Zoledronat aus PDLLA-beschichteten Kirschnerdrähten auf die Frakturheilung und biomechanische Stabilität von Rattentibiae untersucht. Als Kontrollen dienten Gruppen mit unbeschichteten bzw. nur mit PDLLA beschichteten Kirschnerdrähten. Hierzu wurde die rechte Tibia von Sprague-Dawley-Ratten unter standardisierten Bedingungen in Narkose frakturiert und mittels eines Titan K-Drahtes intramedullär stabilisiert. Der Heilungsverlauf wurde radiologisch kontrolliert und der Gesundheitszustand der Tiere durch regelmäßige Inspektion und Bestimmung von Blutbild und Serumparametern überwacht.

Nach 42 bzw. 84 Tagen erfolgte die biomechanische Testung der Tibiae hinsichtlich des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit. Radiologisch wurden Kallusfläche und Kallusüberbrückung bestimmt. Parallel dazu wurden auch Tibiae histomorphometrisch ausgewertet, was jedoch nicht Teil dieser Arbeit war.

1.7. Arbeitshypothese

Durch die lokale Applikation von Zoledronat aus einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung (PDLLA) wird die Frakturheilung beschleunigt. Daraus resultieren eine frühere mechanische Belastbarkeit und eine höhere Stabilität im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Zoledronat.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiermodell

Bei den vorliegenden Versuchen wurden insgesamt 49 Tiere biomechanisch getestet. Dabei handelte es sich um ca. 6 Monate alte, 220-280 Gramm schwere, weibliche Sprague-Dawley Ratten. Versuchstiere dieser Art werden speziell für Forschungszwecke gezüchtet (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland). Da Ratten häufig bei Studien zur Frakturheilung verwendet werden – auch in anderen Versuchen dieser Arbeitsgruppe – existiert bereits eine große Anzahl von Daten über die Frakturheilung bei Ratten (^{75-77;90}).

Vor den operativen Eingriffen befanden sich die Tiere mindestens 3 Tage zur Gewöhnung in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum. Die Ratten wurden nach festgelegten Haltungskonditionen gehalten, mit jeweils 5 Tieren in *Makroloan Typ IV* Käfigen, bei künstlichem 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus und einer artgerechten Raumtemperatur von 20-22°C bei einer Luftfeuchte von 55-60%. Sie hatten dabei freien Zugang zu Wasser und Futter (ssniff Ratten/Mäuse-Haltung, extrudiert, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Die Durchführung dieser Studie wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin am 22.09.2004 unter der Nummer 0177/04 genehmigt.

Die Gliederung erfolgte in drei Gruppen mit je zwei verschiedenen Standzeiten, denen die Tiere randomisiert zugeteilt wurden.

Tab. 1: Gruppeneinteilung nach Beschichtung und Standzeit

Gruppe	Beschichtung	Standzeit	Tieranzahl
Ia	K-Draht ohne Beschichtung	42d	n = 8
Ib	K-Draht ohne Beschichtung	84d	n = 9
IIa	K-Draht mit PDLLA-Beschichtung	42d	n = 8
IIb	K-Draht mit PDLLA-Beschichtung	84d	n = 8
IIIa	K-Draht mit PDLLA und ZOL-Beschichtung	42d	n = 8
IIIb	K-Draht mit PDLLA und ZOL-Beschichtung	84d	n = 8

2.2. Implantate

Titan-Kirschnerdrähte als Marknagel

Die bei den Versuchen verwendeten Implantate dienten einerseits dem Zweck einer intramedullären Frakturstabilisierung und andererseits als Mittel zur direkten lokalen Applikation von Zoledronat in den Frakturspalt.

Hierbei wurden 15 cm lange Titan-Kirschnerdrähte mit einem Durchmesser von 1 mm von der Firma Synthes verwendet (Fa. Synthes, Clinical House GmbH, Bochum, Deutschland). Diese wurden entweder unbeschichtet als Leergruppe, mit der Trägersubstanz PDLLA oder mit PDLLA und eingearbeitetem Zoledronat verwendet.

Das Trägermaterial PDLLA

Das Trägermaterial für die Beschichtung war Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) mit einem Molekulargewicht von 30,000 Da, Resomer 203 (Fa. Boehringer, Ingelheim, Deutschland).

Die Wirksubstanz Zoledronat

Zoledronat (Abb. 2) bzw. 1-OH-2-Imidazolyl-Ethyliden-1,1-Bisphosphonat, ist ein Bisphosphonat der dritten Generation und Pyrophosphat-Analogon. Am zentralen C-Atom trägt es neben einer OH-Gruppe einen Imidazolring. Es wurde Zoledronat als Reinsubstanz von der Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland) verwendet.

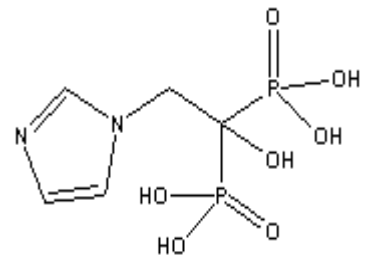


Abb. 3: Zoledronat

Herstellung der Beschichtung

Bei der Herstellung der Implantatbeschichtung wurden 100 mg PDLLA in 1,5 ml Ethylacetat bei Raumtemperatur gelöst und die Lösung steril gefiltert. Um die gewünschte Konzentration zu erhalten, wurde 1,95 mg Zoledronat in einem 1,5 ml PDLLA/Ethylacetat-Gemisch gelöst. Dies ergab eine Konzentration von 50µM bzw. 1,95% (w/w) in der Polymerbeschichtung,

Sterile Titan-Kirschnerdrähte wurden zweimal in die Beschichtungslösung getaucht und jeweils nach dem Eintauchen unter *Lamina air flow* Bedingungen getrocknet.

2.3. Frakturmodell und Frakturmaschine

In allen Versuchstieren wurde ein definierter Bruch der rechten Tibia und Fibula mit einer Frakturmaschine (Abb. 3) erzeugt.

Das Ziel war es, entsprechend der Fraktur-Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO), eine geschlossene Querfraktur des Tibiaschaftes und der Fibula mit minimalem Weichteilschaden zu erreichen (AO 42-A1/A2/A3).

Bei dem Frakturmodell wurde das Prinzip der Dreipunktbiegung angewendet. Dabei wurde das nach außen rotierte rechte Bein auf zwei Schienen mit 20 mm Abstand gelagert und mit einer variabel verstellbaren Stopplatte fixiert.

Auf dem Margo anterior tibiae, der kaum von Weichteilen bedeckt ist, wurde ein durch drei Stifte geführter Stempel so platziert, dass das Bein 2-4 mm proximal der Syndesmosis tibiofibularis fest in der eingestellten Position gehalten wurde. Durch den Stempel wurde die Tibia mit einer Masse von insgesamt 650 g belastet, wovon 50 g auf den Stempel und die Führungsstange entfielen und 600 g auf ein Schlag-Gewicht, das in 15 cm Höhe an der Führungsstange befestigt war.

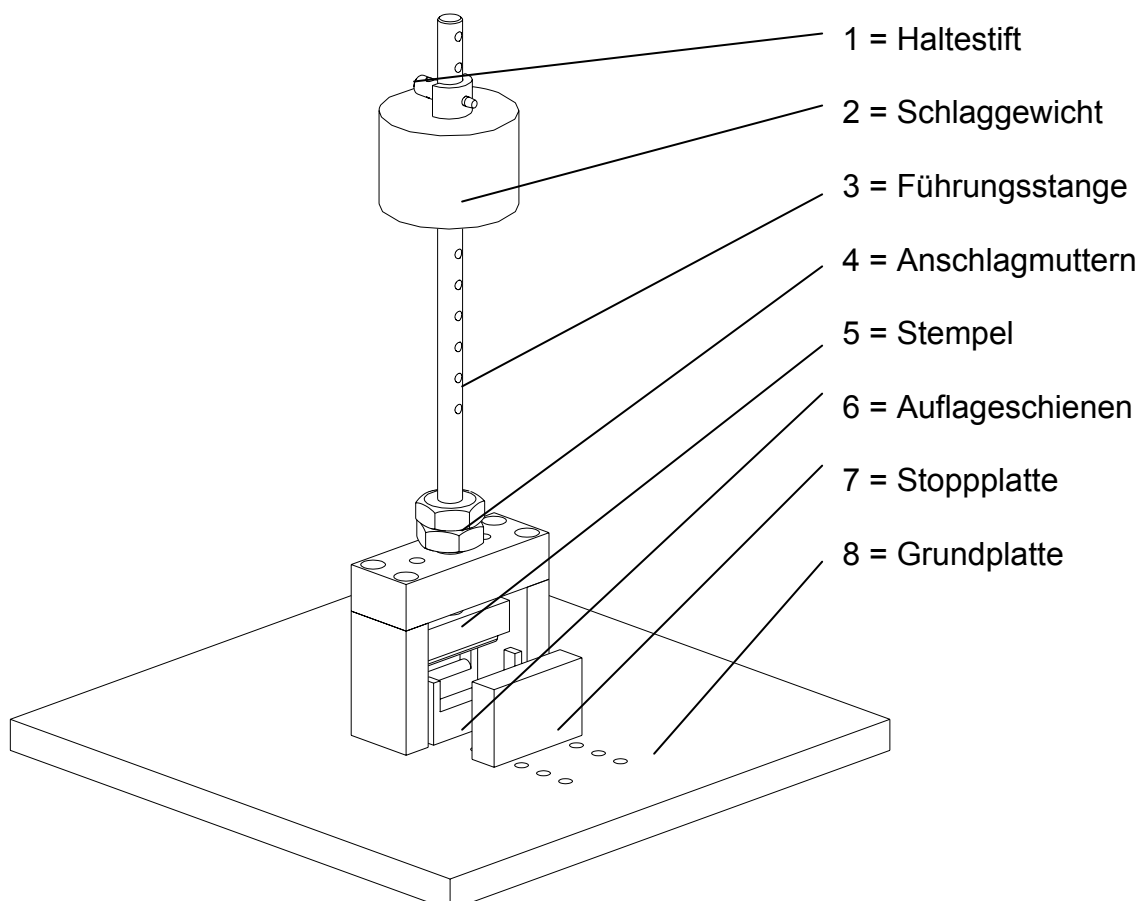


Abb 4: Schemaskizze der im Versuchsaufbau verwendeten Frakturmaschine mit Beschriftung

Nach manuellem Entfernen eines Haltestiftes fiel das Schlaggewicht durch die Stange geführt auf den Stempel. Die Schlagkraft ($F = 6,38 \text{ N}$), die durch die Aufprallgeschwindigkeit ($v = 1,72 \text{ m/s}$) entstand, führte zu einer geschlossenen Fraktur von Tibia und Fibula mit damit verbundenem Weichteilschaden. Verstellbare Anschlagmuttern verhinderten dabei, dass der Stempel zu tief durch das Bein drang.

Die Berechnung des Frakturimpulses erfolgt bei den gegebenen Größen von Masse ($m = 0,650 \text{ kg}$), Höhe ($h = 0,15 \text{ m}$) und Beschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) über folgende physikalische Formeln:

$$\text{Aufprallgeschwindigkeit: } v = g * t \quad (= \sqrt{2 h * g})$$

$$v = 1,72 \text{ m/s}$$

$$\text{Schlagkraft: } F = m * g$$

$$F = 6,38 \text{ N (kg * m/s}^2\text{)}$$

2.4. Anästhesie

Material

- Narkosegerät Artec Typ Vet, Nr. 10495186 (Stephan GmbH Medizintechnik, 56412 Gackenbach, Deutschland)
- 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran), Forene® (Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Ursotamin® (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland)
- Wirkstoff Xylacinhydrochlorid, Rompun 2% (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
- Einmalspritzen 1ml (BD Plastipak™, Becton Dickinson SA, Madrid, Spanien)
- Narkosebox mit Schlauchsystem und Inhalationsmaske
- Kanülen, steril, 24G (BD Microlance™ 3, BD Drogheda, Irland)

Durchführung (Inhalationsnarkose und Injektionsnarkose)

Vor den Operationen und vor den Nachuntersuchungen wurden die Tiere mit einer Inhalationsnarkose sediert. Hierfür wurden sie in eine zu diesem Zweck konstruierte Plastikbox gesetzt, in die ein Gasgemisch eingeleitet wurde (Isofluran 5%; Sauerstoff

0,7 ml/min; Lachgas 0,7 ml/min). Zu den Nachuntersuchungen konnte die Inhalationsnarkose über eine Maske fortgesetzt werden, die den Tieren über Nase und Maul gelegt wurde.

Für die Operationen und für die Tötung am Ende der Standzeit wurde den Tieren zusätzlich eine intraperitoneale Injektionsnarkose appliziert. Hierzu wurden Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml; 80 mg/kg Körpergewicht) und Xylacinhydrochlorid (12 mg/kg Körpergewicht) im Verhältnis von 1,2: 0,9 i.E. gemischt. Dies erfolgte gemäß einer Empfehlung des „Handbook of Laboratory Animal Management und Welfare“ von Sarah Wolfensohn (University of Oxford) ⁽⁹²⁾. Durch diese Anästhesie wurden die Tiere für ca. eine Stunde sediert und analgesiert, was die Durchführung des operativen Eingriffs erlaubte.

2.5. Operation

Material

- Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aeskulap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Enthaarungscreme Plica® (Thioglycolsäure, Fa: Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Sterile Einmalhandschuhe (Gammex® PF; Ansell (UK) Ltd, Tamworth, Staffordshire, UK)
- OP-Gesichtsmaske (Farstar® GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Ethanol 100%, Softasept®N (Fa: B/Braun, Melsungen, Deutschland)
- Sterile Tupfer, 20 x 20 cm, Gr.3 (Maimed, Neuenkirchen, Deutschland)
- Steriles OP-Tuch (Foliodrape®, PaulHartmann AG, Heidenheim, Deutschland)
- Sprühpflaster Band-Aid™ (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Braunes Pflaster: Leukoplast® (Fa: Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)
- unsteriles OP-Tuch, Krankenunterlage 60 x 90 cm
- Steriles OP-Besteck mit:
 - Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan)
 - Hautfäden: Prolene® 5-0, blau, nicht resorbierbares Nahtmaterial (Fa: Ethicon® INC, Somerville, New Jersey, USA)

- Zange
- Schere
- Nadelhalter
- Pinzette
- Intramedullärer Kraftträger, Titan-Kirschnerdraht, \varnothing 1 mm, L 280 mm (Fa: Synthes®, Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz) unbeschichtet oder PDLLA- oder PDLLA+ZOL-beschichtet
- 1,0 mm Kirschnerdraht aus Stahl
- 0,8 mm Kirschnerstrahl aus Stahl
- Röntgen-Bogen, Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Deutschland)

Durchführung

Die Operationen fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Hierzu wurde das Operationsfeld zu Beginn mit einem sterilen Abdecktuch bedeckt, auf welchem das sterile Operationsbesteck angeordnet wurde.

Nach Inhalations- und Injektionsnarkose (s. 2.4.), farblicher Markierung der Tiere an den Schwänzen, Blutentnahme und der Bestimmung von Gewicht und rektaler Temperatur (s. 2.6.), wurde der zu operierende rechte Hinterlauf der Tiere mit einem Elektrorasierer enthaart, mit einer Depilierungscreme vollständig gesäubert und zuletzt mit Ethanol desinfiziert, um das Infektionsrisiko zu minimieren.

Anschließend erfolgte die Umlagerung des Tieres auf das Operationsfeld. Nach erneuter Desinfektion des zu operierenden Beins mit Ethanol wurde über der Tuberositas Tibiae eine ca. 3 mm lange Stichinzision vorgenommen. Die Kortikalis wurde mit einem 1mm breiten Stahldraht durchbohrt und der Markraum vorsichtig dilatiert. Das sich nach distal verjüngende Ende der Tibia wurde mit einem 0,8 mm starken Stahldraht vorgebohrt. Anschließend wurde der Draht entfernt und mit Hilfe der Frakturmaschine (s. 2.3.) eine geschlossene Fraktur der Tibia durchgeführt.

Nach Reposition der Frakturenenden unter Röntgenkontrolle wurde der Kirschner Draht in den Markraum eingeführt, über den Frakturspalt ins distale Ende vorgeschoben und nach einer abschließenden Kontrolle durch einen Bildwandler mit einer Kneifzange an der Eintrittsstelle in die Kortikalis abgetrennt, woraus eine durchschnittliche Länge von ca. 3,5 cm resultierte.

Der Hautschnitt wurde mit einem 5-0 Prolene®-Hautfaden verschlossen und mit einem Sprühpflaster überdeckt.

Zum Schutz und zur Stabilisierung des Hinterlaufs wurde dieser anschließend mit braunen Leukoplast®-Pflasterstreifen unter gegenläufiger Führung verbunden.

2.6. Kontrollparameter-Untersuchungen

Material

- Präzisionswaage Typ TE6100 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Thermometer (Montmann, Deutschland)
- Gleitmittel: Lidocainhydrochlorid, Xylocain® Gel 2% (Firma: Astra GmbH, Wedel, Deutschland)
- Hämatokrit-Kapillaren 75 mm / 60 µl (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Serumröhrchen, GK 150 L / 200 µl, grün (Kabe Labortechnik GmbH, Numbrecht-Elsenroth, Deutschland)
- Blutbildröhrchen, GK 150 EDTA / 200 µl, violett (Kabe Labortechnik GmbH, Numbrecht-Elsenroth, Deutschland)
- Heparinnatrium, Liquemin® N25000 (Roche, Grenzach-Whylen Deutschland)
- Sterile Tupfer 20 x 20 cm, Gr.3 (Maimed GmbH&Co.KG, Neuenkirchen, Deutschland)
- Dexpanthenol, Panthenol® Augensalbe (Jenapharm, Biberach/Riss, Deutschland)
- Klebeetiketten mit Tiernummern
- Bleistift
- Filzstifte (Edding Nr. 3000) in den Farben blau, rot, grün und schwarz (Edding AG, Ahrensburg, Deutschland)

Durchführung

Präoperativ (Tag 1), sowie an allen Kontrolltagen (je nach Standzeit nach 14, 28 und 42 oder zusätzlich 84 Tagen) wurden die Tiere auf Körperkerntemperatur, Gewicht, Blutbild und Serumparameter hin untersucht und eine tierspezifische Identifikationsmarkierung am Schwanz angebracht.

Nach einer initialen Anästhesie (s. 2.4.) wurden die Tiere gewogen und die jeweilige Körperkerntemperatur rektal ermittelt. Die Blutabnahme erfolgte durch

Punktion des retrobulbären Venenplexus durch den medialen Augenwinkel mit einer heparinisierten Kapillare⁽⁶⁷⁾.

Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 20 ml lag die entnommene Menge (1,5 ml) unter der von der Gesellschaft für Versuchstierkunde angegebenen Maximalmenge von 10%⁽²³⁾. Das gewonnene Blut wurde in Serum- und Blutröhrchen für die spätere Analyse gesammelt. Anschließend wurde das Auge zur Blutstillung mit einem sterilen Tupfer leicht komprimiert. Bei den Operationen wurde zum Schutz der Augen vor Austrocknung daraufhin eine Panthenol®-Augensalbe aufgetragen.

Die Markierung der Tiere wurde am Schwanz mit wasserfesten Farbstiften nach einem vorher festgelegten Code vorgenommen.

Bei dem abgenommenen Blut wurde das Plasma auf Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Glukose, Kreatinin, CRP und alkalische Phosphatase untersucht. Ferner wurden Blutbild und Hämoglobin bestimmt.

2.7. Röntgen

Material

- Röntgengerät: Siemens Röntgenstrahler „Mobilett Plus“, Modell No. 6215300 X037E (SiemensAG, München, Deutschland)
- Digitale Röntgenplatten: Fuji IP Cassette 3A, 24 x 30 cm (Fa: Fuji Photo Film Co., LTD., Japan)
- Röntgenzahlen
- Pflaster, Leukosilk® (Beiersdorf, Homburg, Deutschland)

Durchführung

Postoperativ, jeweils nach den Nachuntersuchungen und am Tötungstag vor der Entnahme der Tibia wurde die narkotisierte Ratte zur Kontrolle der Fraktur und des ersten Repositionsergebnisses in 2 Ebenen (lateral und p.a.) geröntgt.

Während direkt postoperativ die Kontrolle der korrekten Lage des Implantats im Vordergrund stand, galt das Hauptaugenmerk bei den Nachuntersuchungen in erster Linie der Beurteilung der Frakturkonsolidierung, ferner jedoch auch der Detektion eventueller Implantatdislokationen oder Infektzeichen (z.B. Osteolysen).

Der Abstand des Röntgengerätes zur Platte betrug 60 cm bei einer Strahlenhärte von 55 kV und einer Belichtungszeit von 1,8 mAs. Zur lateralen Aufnahme wurde das Tier auf den Bauch gelegt und das rechte operierte Bein abduziert und außenrotiert auf der Röntgenplatte fixiert. Für die posterior-anterior-Aufnahme wurde der Hinterlauf um 90° gedreht, so dass der Calcaneus senkrecht zum Röntgenfilm zeigte und wiederum mit Pflastern fixiert.

Zur exakten radiologischen Identifikation wurde die jeweilige Versuchstiernummer mit Röntgenzahlen in den eingestellten Bildausschnitt gelegt.

2.8. Nachsorge

Postoperativ wurden die Tiere nach Anlegen des Verbandes und den abschließenden Röntgenaufnahmen - immer noch sediert - in ihren Käfig zurückgelegt und zum Schutz vor Temperaturverlusten mit Streu umgeben. Im Rahmen der festgelegten Haltungskonditionen der Einrichtung wurden die Tiere zusätzlich täglich durch das Personal auf Befinden und hygienische Zustände kontrolliert. Die Tiere tolerierten die OP gut und erlangten ihre normale Aktivität innerhalb kurzer Zeit wieder.

2.9. Tötung und Implantatentfernung

Material

- Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Ursotamin® (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland)
- Wirkstoff Xylacinhydrochlorid, Rompun 2% (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
- Wirkstoff Kaliumchlorid 14,9% (Fa: B/Braun, Melsungen Deutschland)
- Einmalspritzen 1 ml (BD Plastipak™, Becton Dickinson SA, Madrid, Spanien)
- Kanülen, steril, 24 G (BD Microlance™ 3, BD Drogheda, Irland)
- Einmalhandschuhe (Johnson&Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A.)
- Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan)
- Pinzette (Aeskulap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Präparierschere (Aeskulap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Nadelhalter (Aeskulap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland)

- Isotonische Kochsalzlösung Plastipur®, Fresenius, Deutschland GmbH; Bad Homburg, Deutschland)
- Mullkompressen, 10 cm x 10 cm 8-fach, BEESANA® (Karl Beese GmbH&Co., Bursbüttel, Deutschland)

Durchführung

Je nach Gruppenstandzeit wurden die Tiere am Tag 42 oder 84 getötet. Nach einer abschließenden Untersuchung und Röntgenaufnahmen (s. 2.7.) unter Inhalationsnarkose (s. 2.4.) erhielten die Tiere eine Überdosis an Injektionsnarkose (Ketaminhydrochlorid: Xylacinhydrochlorid im Verhältnis 1,5: 1 mit 6 i.E.). Anschließend erfolgte eine intrakardiale Injektion von ca. 1 ml 14,9%iger Kaliumchloridlösung. Gleich danach wurde die rechte Tibia freipräpariert und in Knie- und oberem Sprunggelenk exartikuliert. Ohne das Periost zu beschädigen, wurden nun die Weichteile, Haut und Fell mit Pinzette, Schere und Skalpell abgelöst.

Nach der Entfernung der Fibula an ihren Ansatzpunkten wurden zusätzlich am distalen und proximalen Ende der Tibia alle Sehnen, Muskelreste und das Periost entfernt, um eine Einbettung ohne Gewebeteile sicher zu stellen. Mit der gleichen Vorgehensweise wurde auch die nichtfrakturierte linke Tibia freipräpariert, die bei der biomechanischen Testung jeweils als Referenz diente.

Zur Entfernung des Implantats wurde dessen proximales Ende um die Tuberositas Tibiae herum so weit freigelegt, dass es mit einem Nadelhalter gut fassbar war. Das Implantat wurde daraufhin unter leichten Drehbewegungen und konstantem axialem Zug entfernt, wobei darauf zu achten war, dass die Tibia proximal der Fraktur mit den Fingern fixiert blieb, um zu gewährleisten, dass die ehemalige Frakturstelle nur minimalen Belastungen ausgesetzt wurde.

Die Tibiae wurden letztlich mit Mullkompressen umhüllt und mit 0,9% NaCl angefeuchtet gehalten, um ein Austrocknen und damit bei der Testung eine Verfälschung der Werte zu verhindern.

2.10. Biomechanische Testung

2.10.1. Material

- Flüssigkeit - Methylmethacrylat, N,N-dimethyl-p-toluidin, 1000 ml, „Technovit® 3040“ (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Pulver - Kaltpolymerisierender Kunststoff, gelb, 1000 g, „Technovit®3040“ (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- 10 ml Einmal-Spritzen
- Isotonische Kochsalzlösung Plastipur®, Fresenius, Deutschland GmbH; Bad Homburg, Deutschland)
- Sterile Einmalhandschuhe (Gammex® PF; Ansell (UK) Ltd, Tamworth, Staffordshire, UK)
- Wasserwaage
- Haltevorrichtung
- Winkel (DIN 875/1, Fa. ORION, Deutschland)
- Transportklemme
- Visiervorrichtung
- Pflaster, Leukosilk® (Beiersdorf, Homburg, Deutschland)
- Einbettformen (Plastik Delrin) 3 cm x 3 cm x 2,5 cm; Innendurchmesser 1,1 cm x 1,1 cm x 1,5 cm
- Torsionsmaschine (s. 2.10.2.)
- Materialprüfmaschine 1455 (Fa. Zwick®, Ulm, Deutschland)
- Kraftmessdose CM 30N D (Fa. Wazau Mess- und Prüfsysteme GmbH, Berlin)
- Handsäge
- Software: Catman2.1.® (Fa. HBM, Darmstadt, Deutschland), Zwick® (Ulm, Deutschland), Excel (Fa. Microsoft, USA)
- 2 Rechner und 1 Drucker

2.10.2. Die Torsionsmaschine

Die Torsionsmaschine ist aus Aluminium gefertigt und auf einer Bodenplatte befestigt. Sie wurde am Testungstag in der Materialprüfmaschine positioniert und arretiert. Im Einzelnen besteht sie (Abb. 4) aus:

1. Zwei Einbettformen zur Fixierung des Knochens (in Abb. 4 bereits mit eingebettetem Knochen)
2. Einer linearen konstanten Kraft (hervorgerufen durch eine Materialprüfmaschine, Zwick®, Ulm, Deutschland)
3. Zwei Hebelarme für die Übertragung der Kraft auf die Rotationsachse
4. Zwei Nadellager zur Reibungsverminderung
5. Eine Kraftmessdose zur Drehmomentbestimmung, mit einem Verbindungskabel zu einem Rechner
6. Ein Gewicht als axiale Vorlast (5 N)
7. Computer (nicht abgebildet) für die Berechnung des maximalen Drehmoment und der maximalen torsionalen Steifigkeit (Software: Catman®; Fa: HBM Deutschland)

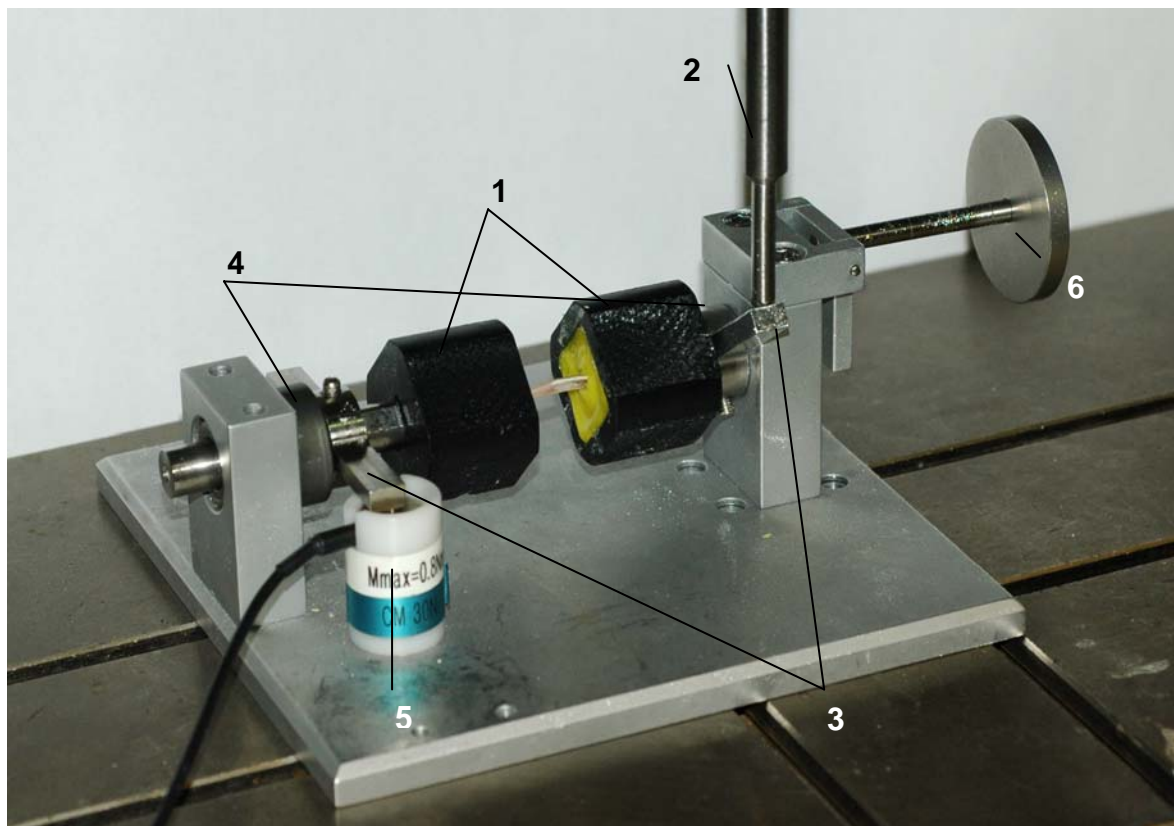


Abb. 5: Abbildung der Torsionsmaschine mit Beschriftung

2.10.3. Einbettung der Tibiae

Die Tibiae wurden zuerst mit dem proximalen Anteil in eine für diesen Zweck entworfene Haltekonstruktion eingespannt (s. Abb. 5a). Der distale Teil wurde ohne Bodenkontakt frei in eine darunter gestellte Form positioniert. Vor allem der mittlere bzw. frakturierte Abschnitt des Knochens befand sich hierbei in einer achsengerechten und zentralen Lage.

Entlang des Knochenschaftes wurde eine virtuelle Achse gelegt, nach welcher der Knochen senkrecht und zentriert ausgerichtet wurde. Die senkrechte Stellung wurde durch eine Wasserwaage und eine Visierhilfe aus Plexiglas kontrolliert. Letztere war für diese Versuchsanordnung zur Knochenzentrierung entwickelt worden und bestand aus zwei senkrecht zueinander stehenden Scheiben (3 cm x 1,5 cm x 0,5 cm). Die zentralisierte Position des Knochens wurde dabei über zwei Linien eingestellt, welche mittig vertikal in die Scheiben eingeschliffen waren (Abb. 5b).

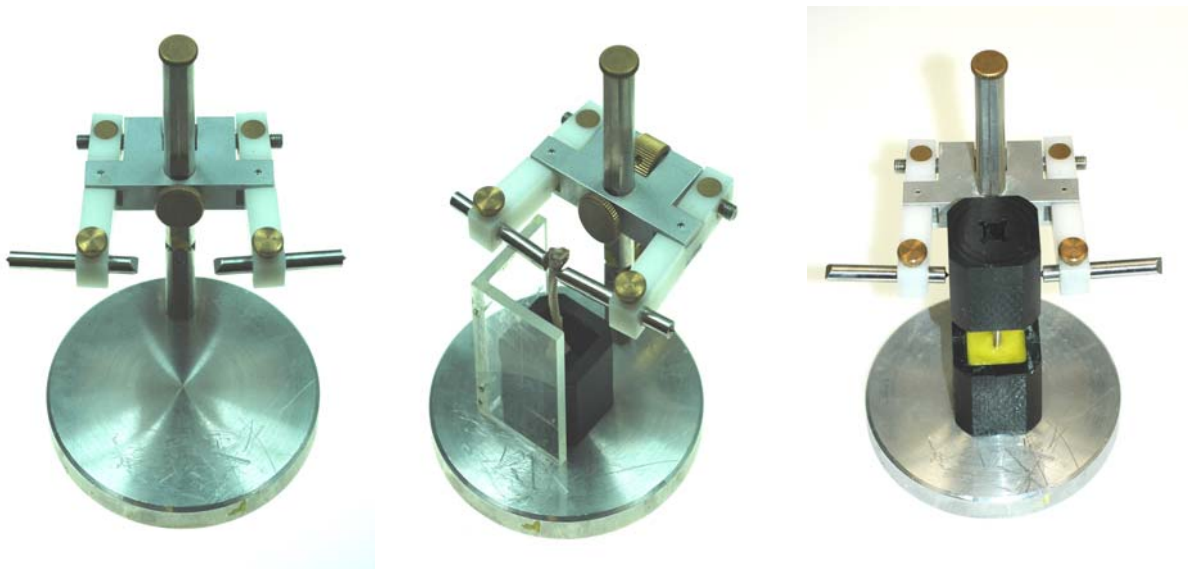


Abb. 6: Haltevorrichtung (a); Haltevorrichtung mit eingespannter Tibia und angelegter Visierhilfe (b); Haltevorrichtung mit beidseits eingebetteter Tibia (c)

Nachdem die richtige Position des Knochens sichergestellt worden war, wurde der Zement erstellt und in die Einbettform gefüllt. Nach Aushärten des Zements (ca. 10 min) wurde die Form selbst in die Haltevorrichtung eingespannt und das proximale Ende eingebettet, wobei ein vorgegebener Abstand von 1,8 cm mit einer Schiebelehre bestimmt wurde (s. Abb. 5c).

Während der Umbettung und Aushärtung wurde die Tibia ständig mit isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten, um ein Austrocknen von Knochen und Kallus zu verhindern.

Für den Transport von der Einbettstelle zur Torsionsmaschine wurde eine eigens zu diesem Zweck konstruierte Haltevorrichtung verwendet.

2.10.4. Die torsionale Testung

Nach erfolgter Einbettung und Aushärtung des Zements wurde die Tibia mit den Einbettformen in die Torsionsmaschine eingefügt, dort arretiert und mit einer axialen Vorlast von 5 N belastet. Diese sollte einen gleichmäßigen Druck auf den gesamten Knochen bewirken, wodurch die Kräfte von Zugbelastungen minimiert werden sollten, die bei torsionalen Testungen auftreten und auf Längenänderungen beruhen.

Nach Aktivierung der Materialprüfmaschine Zwick® 1455 übte diese mit konstanter Geschwindigkeit und bei linearer Bewegung eine konstante Belastung auf den Hebelarm der Torsionsmaschine aus, welcher diese Kraft in eine Drehbewegung transponierte. Die durch die Torsion entstehende Auflagekraft wurde somit durch den Hebelarm (30mm) übertragen und an einer Kraftmeßdose (30N) gemessen. Über das Produkt von Kraft [F] x Hebelarm [m] ließ sich das wirkende Moment errechnen.

Die Materialprüfmaschine wurde darauf hin programmiert, bei Erreichen des maximalen Drehmoments automatisch die Belastung abubrechen, sobald der zuletzt gemessene Wert um mehr als 8% unter dem zuvor gemessenen lag.

Nach Beendigung der Testung wurde die Tibia mit einer Handsäge proximal und distal so nah wie möglich an der Zement-Einbettung abgetrennt und in eine Fixierlösung für die folgende histologische Aufarbeitung gegeben.

2.10.5. Auswertung der Daten

Die Werte der Tibiae, die bei der Testung mit dem Messkraftverstärker MCG aufgenommen wurden, wurden im Catman 2.1.® Programm als Datei „ASC II mit HEADER“ gespeichert, wodurch eine Berechnung der Maxima von Drehmoment [Nmm], Kraft [N] und Masse [g] ermöglicht wurde.

Als Aussagekraft sollten das maximale Drehmoment [Hebelarmlänge x Kraftwirkung] und die maximale torsionale Steifigkeit gelten. Um die Steifigkeit zu berechnen [Drehmoment/ Winkeländerung] wurden die Daten formatiert und in Excel® eingelesen. Bei jedem Test einer Tibia wurden ca. 5000 Werte bestimmt. Bei dem aus diesen Werten ermittelten Graf (Abb. 6) trug die Y-Achse die Bezeichnung „Drehmoment in [Nmm]“ und die X-Achse „Winkeländerung des Knochens in [°]“. Die Steifigkeit des Knochens wurde durch die Steigung des Grafen wiedergegeben [$m = Yb - Ya / Xb - Xa$].

Die Steigung (= Steifigkeit) wurde aus dem linearen Teil der Kurve durch das tangentielle Anlegen einer Gerade ermittelt (in Abb. 6 hellrot gefärbt).

Die ersten 30 bis 150 Werte der Messung wurden als Setzungsartefakte verworfen.

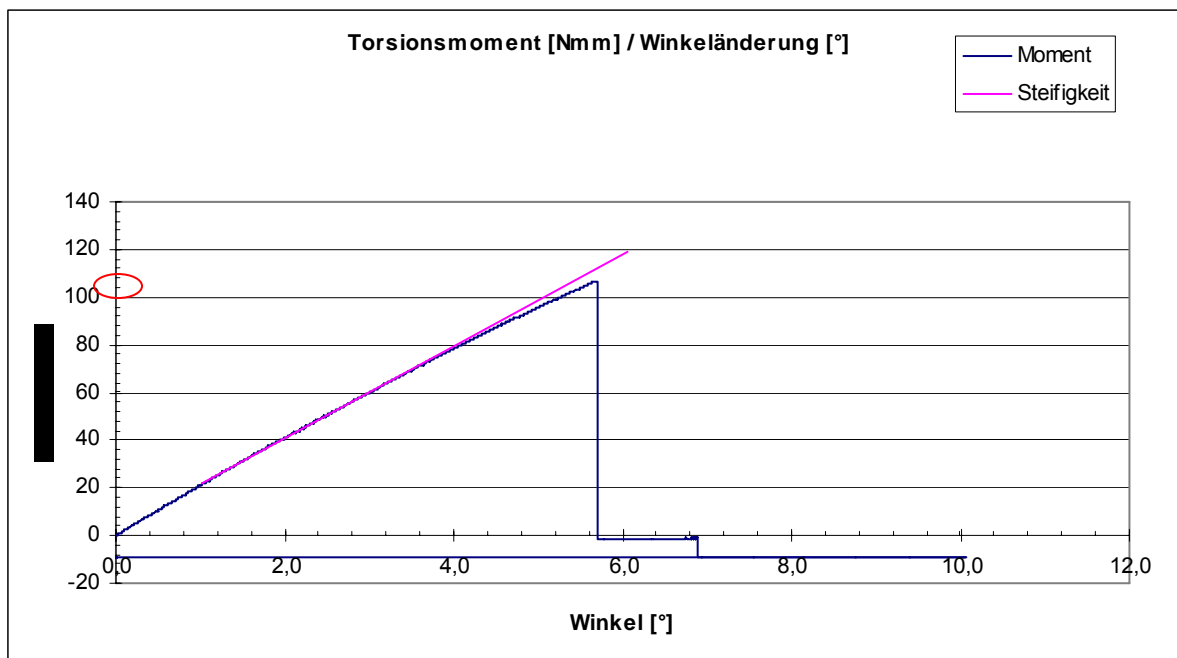


Abb. 7: Testkurve einer Rattentibia. Auf der Y-Achse markiert, der Punkt der maximalen Kraft, die zur Fraktur der Tibia aufgewendet wurde. Die hellrote Gerade wurde tangential angelegt und hierüber die torsionale Steifigkeit ermittelt.

Zum Ausschluss interindividueller Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren, wurden bei jedem Tier das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit des frakturierten Knochens in Prozent zur kontralateralen unfrakturierten Seite ausgedrückt $[(\text{frakturiert} / \text{unfrakturiert}) \times 100]$.

Sowohl bei den Gruppen mit 42 Tagen Standzeit als auch bei denen mit 84 Tagen Standzeit wurden jeweils 8 Tiere getestet ($n = 8$). Lediglich in der Gruppe ohne Beschichtung gab es bei 84d Standzeit eine Zahl von $n = 9$. Die Standartabweichung wurde jeweils ermittelt, indem aus den einzelnen Ergebnissen das arithmetische Mittel gebildet wurde $[X1 + X2 + \dots + X8 / 8]$.

2.11. Reliabilität der Torsionsmaschine

Beim Reliabilitätstest wurde ein Plastikstift mit einem Durchmesser von 3,0 mm so eingebettet, dass der Abstand zwischen den Einbettformen exakt 1,8 mm betrug. Daraufhin wurde dieser Stift zehn Mal mit der Torsionsmaschine auf seine torsionale Steifigkeit getestet. Hierbei wird die maximale Belastung durch die Maschine so gewählt, dass es zu keiner irreversiblen Verformung des Plastikstiftes kam. Der Test verlief somit innerhalb des linearen Bereichs der Drehwinkel-Deformationskurve.

2.12. Radiologische Auswertung

Die Röntgenkontrollaufnahmen wurden visuell hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu Stufen der AO-Klassifikation, Ausmaß der Frakturkonsolidierung und Vorliegen von Heilungsstörungen beurteilt. Ferner wurde die Kallusfläche mit Hilfe des Programm *ImageJ* (Version 1.24o, National Institutes of Health, USA) bestimmt. Hierzu war in der Literatur bereits durch Reikerås et al. ⁽⁶⁶⁾ eine annähernde Kallusflächenberechnung beschrieben worden, die mittels antero-posteriorem (A) und lateralem Kallusdurchmesser (B) und der Formel „*Ellipsenfläche* = $\pi * A/2 * B/2$ “ erfolgte.

Um eine Aussage zum Widerstand treffen zu können, den der Kallus-Bereich einer torsionalen Kraft entgegenbringt, wurde zusätzlich das polare Flächenträgheitsmoment (PFTM) mit der Formel „*PFTM* = $\pi/4 * (A/2 * B^3/2 - a/2 * b^3/2) + \pi/4 * (A^3/2 * B/2 - a^3/2 * b/2)$ “ berechnet (a und b waren hierbei die Innendurchmesser des Bohrkanals des K-Drahtes).

Im Detail erfolgte die Berechnung der Kallusausmaße an den Röntgenbildern, indem bei angelegtem Zentimetermaß die Distanz von 1cm mit dem Programm ImageJ (s.o.) elektronisch bestimmt wurde. Dies diente als Referenz für das Programm, um dann die Kallusdurchmesser in den jeweiligen Ebenen zu bestimmen. Zuvor wurde die Durchführung der Methode jedoch bei jedem Röntgenbild erneut validiert, indem drei Probemessungen des implantierten K-Drahtes (mit dem bekannten Durchmesser von 1mm) erfolgten. Diese wurden anschließend gemittelt, um ggf. einen Umrechnungsfaktor für die Bestimmung der eigentlichen Kallusausmaße zu erhalten.

2.13. Statistik

Für die statistische Auswertung der radiologischen und biomechanischen Daten wurden der Kruskal-Wallis-Test und der U-Test von Wicoxon Mann und Whitney, sowie die Bonferroni-Korrektur angewandt, da es sich bei den Ergebnissen der einzelnen Gruppen um unabhängige, nicht parametrisch verteilte Daten handelte. Zusätzlich wurden noch Spearman's Korrelationskoeffizient für die Korrelation von Kallusfläche und biomechanischer Ergebnisse, der Kappa-Koeffizient für die Begutachter-Übereinstimmung hinsichtlich der Kalluskonsolidierung (^{72:87}). Für die Berechnung der statistischen Daten wurde die Statistiksoftware SPSS® (Version 14.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Kontrollparameter-Überwachung

Die Operation wurde von den Tieren gut toleriert. Innerhalb weniger Tage nach dem Eingriff konnten sie das operierte Bein voll belasten. Es zeigten sich keine radiologischen Hinweise auf Infektionen oder Osteolysen und bei der klinischen Inspektion ließen sich keine Anzeichen für ein Kompartmentsyndrom beobachten.

Die Gewichtsbestimmung ergab nur bei der Kontrollgruppe mit unbeschichteten Implantaten 14 Tage postoperativ einen leichten Abfall, während die anderen Gruppen leicht an Gewicht zulegten. Bei allen Gruppen konnte jedoch im Verlauf eine auch alterungsbedingte Gewichtszunahme beobachtet werden (Tab. 2).

Die lokale Applikation von Zoledronat oder PDLLA hatte keinen relevanten Einfluss auf die Temperaturwerte bei den Tieren der einzelnen Gruppen (Tab. 2).

Tab. 2: Temperatur und Körpergewicht der Versuchstiere im zeitlichen Verlauf

	Gruppe	Tag 0 (präoperativ)	Tag 14	Tag 28	Tag 42	Tag 84
Gewicht (g)	Kontrolle	241 ± 12	239 ± 14	256 ± 16	265 ± 18	282 ± 20
	PDLLA	249 ± 20	255 ± 18	264 ± 11	281 ± 8	285 ± 13
	ZOL	240 ± 15	242 ± 17	248 ± 20	252 ± 14	279 ± 11
Temperatur (°C)	Kontrolle	36,0 ± 0,7	36,8 ± 0,8	36,7 ± 1,0	36,6 ± 0,5	36,3 ± 0,4
	PDLLA	36,1 ± 0,9	37,0 ± 0,8	36,5 ± 0,7	36,3 ± 0,5	36,3 ± 0,5
	ZOL	36,0 ± 0,8	36,6 ± 0,6	36,8 ± 0,9	36,2 ± 0,7	36,5 ± 0,3

Der Entzündungsmarker CRP (C-reaktives Protein) war zu keinem Zeitpunkt der Messung erhöht. Auch konnten keine signifikanten Veränderungen bei Blutbild und Hämoglobinwerten beobachtet werden und die untersuchten Serumparameter Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Glukose, Kreatinin und alkalische Phosphatase zeigten keine signifikanten Veränderungen, die mit einem systemischen Effekt von Zoledronat hätten assoziiert werden können.

3.2. Radiologische Frakturklassifikation

Die radiologischen Kontrollaufnahmen der initialen intraoperativen Frakturergebnisse wurden ausgewertet und gemäß der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO-Klassifikation) einzelnen Frakturformen zugeordnet (⁷⁴).





AO Klassifikation der Tibia (AO 42)	A1	A2	A3	B2
				
Anzahl der Tiere	3	4	41	1
Anzahl in %	6	8	84	2

Abb. 8: Anteil der erzielten Frakturen (gemäß AO-Klassifikation) an der Gesamtmenge der Versuchstiere mit Beispielbildern der Frakturmuster in Anlehnung an www.aofoundation.org

In 48 Fällen kam es zu einer Fraktur ohne zusätzliche Knochenfragmente im Sinne einer AO-Fraktur 42-A, wobei 3 Tiere eine spiralförmige Fraktur gemäß AO 42-A1 aufwiesen, 4 eine schräg verlaufende Fraktur gemäß 42-A2 und die Mehrheit von 41 Tieren eine Querfraktur gemäß AO 42-A3.

Nur bei einer Fraktur kam es zu einem Biegungskeil im Rahmen der Fraktursetzung entsprechend AO 42-B2. Frakturen gemäß AO 42-B1 oder 42-B3 konnten nicht festgestellt werden.

3.3. Kalluskonsolidierung

Zu den Zeitpunkten 28, 42 und 84 Tage wurde der Frakturkallus in allen Gruppen hinsichtlich der kortikalen Frakturkonsolidierung an Hand der Überbrückungszustände der vier Cortices beurteilt (Abb. 8). Entsprechend erfolgte die Einteilung nach *nicht konsolidiert* (kein Cortex überbrückt), *partiell konsolidiert* (ein bis drei Cortices überbrückt) und *vollständig konsolidiert* (alle vier Cortices überbrückt).



Abb. 9: Röntgenaufnahmen der rechten Tibiae von Ratten der drei Gruppen (a = ohne Beschichtung, b = PDLLA, c = ZOL) nach Fraktur bei 42 Tagen Standzeit

Nach 28 Tagen zeigte sich bei einem von 16 Tieren der Kontrollgruppe (im Nachfolgenden wird dieser Bezug als 1/16 dargestellt) keine, bei 9/16 eine partielle und bei 6/16 eine vollständige Konsolidierung. Bei der PDLLA-Gruppe kam es in bei 11/15 zu einer partiellen und bei 4/15 zu einer vollständigen Konsolidierung. Die ZOL-Gruppe wies mit 5/14 partiellen und 9/14 vollständigen Konsolidierungen eine verstärkte Überbrückungstendenz gegenüber beiden Kontrollgruppen auf (Tab. 3).

Zum Zeitpunkt 42 Tage zeigte die Kontrollgruppe bei 8/17 partielle und bei 9/17 vollständige Überbrückungen. Bei der PDLLA-Gruppe waren 5/16 partiell und 11/16 vollständig überbrückt, während bei der ZOL-Gruppe bei 1/16 partieller bei 15/16 der Fälle eine vollständige Konsolidierung stattgefunden hatte, was signifikant

gegenüber der Kontrollgruppe war. Alle Tiere zeigten Anzeichen von Konsolidierung bzw. Überbrückung des Frakturspaltes (Tab. 3).

Nach 84 Tagen war in der ZOL-Gruppe bei 8/8 eine vollständige Konsolidierung festzustellen. Bei der Kontrollgruppe waren 1/9 partiell und 8/9 vollständig und in der PDLLA-Gruppe 1/8 partiell und 7/8 vollständig konsolidiert. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Tiere Anzeichen für eine Überbrückung. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Tab. 3).

Die Röntgenbilder wurden von zwei unabhängigen Beobachtern bewertet, deren Übereinstimmung 81,4% betrug.

Tab. 3: Konsolidierung der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

Konsolidierung	28 Tage			42 Tage			84 Tage		
	Kont.	PDLLA	ZOL	Kont.	PDLLA	ZOL ‡	Kont.	PDLLA	ZOL
Vollständig	6	4	9	9	11	15	8	7	8
Teilweise	9	11	5	8	5	1	1	1	0
Nicht	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tieranzahl	16	15	14	17	16	16	9	8	8

‡ p = 0,01 gegen Kontrolle

3.4. Mittlere Kallusfläche

Ebenfalls an Hand der radiologischen Kontrollaufnahmen wurde bei allen Gruppen die mittlere Kallusfläche (MKF) an den Tagen 28, 42 und 84 bestimmt.

Bereits nach 28 Tagen zeigten die Aufnahmen eine signifikant erhöhte MKF der ZOL-Gruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen. Diese signifikante Erhöhung der MKF der ZOL-Gruppe bestand weiterhin zum Zeitpunkt 42 und 84 Tage, wobei hier zusätzlich auch jeweils die PDLLA-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war.

Tab. 4: Mittlere Kallusfläche der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

Gruppe	28 Tage	42 Tage	84 Tage
Kontrolle	0,144 cm ² ± 0,029	0,124 cm ² ± 0,017	0,111 cm ² ± 0,012
PDLLA	0,145 cm ² ± 0,024	0,139 cm ² ± 0,019 *	0,125 cm ² ± 0,016
ZOL	0,193 cm ² ± 0,041 ‡	0,175 cm ² ± 0,031 †	0,160 cm ² ± 0,027 **

‡ p = 0,002 gegen PDLLA und Kontrolle; † p = 0,002 gegen PDLLA und p < 0,001 gegen Kontrolle; * p = 0,028 gegen Kontrolle; ** p = 0,012 gegen PDLLA und p = 0,004 gegen Kontrolle

3.5. Polares Flächenträgheitsmoment

Auf Grundlage der radiologischen Daten der mittleren Kallusdurchmesser in posteriorer und lateraler Aufnahme, wurde zu 28, 42 und 84 Tagen das polare Flächenträgheitsmoment (PFTM) ermittelt.

Nach 28 Tagen zeigte sich eine signifikante Erhöhung des PFTM der ZOL-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, die zum Zeitpunkt von 42 Tagen immer noch bestand. 84 Tage nach der Fraktur war das PFTM der ZOL-Gruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe und der PDLLA-Gruppe.

Tab. 5: Polares Flächenträgheitsmoment der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

Gruppe	28 Tage	42 Tage	84 Tage
Kontrolle	0,0256 cm ⁴ ± 0,03	0,0174 cm ⁴ ± 0,0186	0,0011 cm ⁴ ± 0,0004
PDLLA	0,0269 cm ⁴ ± 0,031	0,0238 cm ⁴ ± 0,0258	0,0013 cm ⁴ ± 0,0007
ZOL	0,0433 cm ⁴ ± 0,0541 ‡	0,0407 cm ⁴ ± 0,0474 †	0,0021 cm ⁴ ± 0,0014 *

‡ p = 0,031 gegen Kontrolle, † p = 0,02 gegen Kontrolle, * p = 0,004 gegen Kontrolle und p = 0,012 gegen PDLLA

3.6. Makroskopische Begutachtung

Nach Abschluss des biomechanischen Tests wurden die Knochen hinsichtlich der Lokalisation des Versagensbruches makroskopisch beurteilt.

Die ehemals frakturierten rechten Tibiae der Tiere mit 42 Tagen Standzeit zeigten in den meisten Fällen nach der torsionalen Testung ein Versagen im Bereich des Kallus. Bei einigen Knochen kam es zu einer Fraktur oberhalb bzw. unterhalb des Kallus, wobei eine leichte Häufung bei den mit ZOL behandelten Tieren auftrat.

Bei den Tieren mit 84 Tagen Standzeit hatten nach Testung der ehemals frakturierten rechten Tibiae ebenfalls die meisten ein Versagen im Bereich des Kallus. Insgesamt zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Lage der torsionsbedingten Frakturen.

Die nicht frakturierten linken Tibiae wiesen nach der torsionalen Testung unabhängig von ihrer ursprünglichen Gruppenzugehörigkeit und Standzeit der Tiere in allen Fällen einen Spiralbruch in Schaftmitte auf.

3.7. Reliabilität der biomechanischen Ergebnisse

Die Durchführung der Reliabilitätsprüfung mit 10 Testzyklen ergab für den PVC-Stift eine gemittelte torsionale Steifigkeit von 4,16 Nmm/° im linearen Bereich der Drehwinkel-Deformationskurve. Die Standardabweichung betrug dabei $\pm 0,07$ Nmm/°.

3.8. Biomechanische Auswertung

3.8.1. Maximales Drehmoment nach 42 Tagen Standzeit

Nach einer Standzeit von 42 Tagen zeigten die Tiere, deren frakturierte Tibiae mit Zoledronat (ZOL) beschichteten Implantaten versorgt worden waren, mit 197,6% (\pm 14,3%) im Vergleich zur nicht frakturierten Gegenseite ein signifikant höheres maximales Drehmoment (Abb. 9) als die Tiere der anderen Gruppen, die entweder mit PDLLA beschichteten Kirschner-Drähten (129,3% \pm 33,1%) oder mit unbeschichteten Implantaten (121,0% \pm 41,8%) behandelt worden waren.

Hingegen ließ sich zwischen den Tieren der PDLLA-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe bezüglich des maximalen Drehmomentes kein signifikanter Unterschied feststellen.

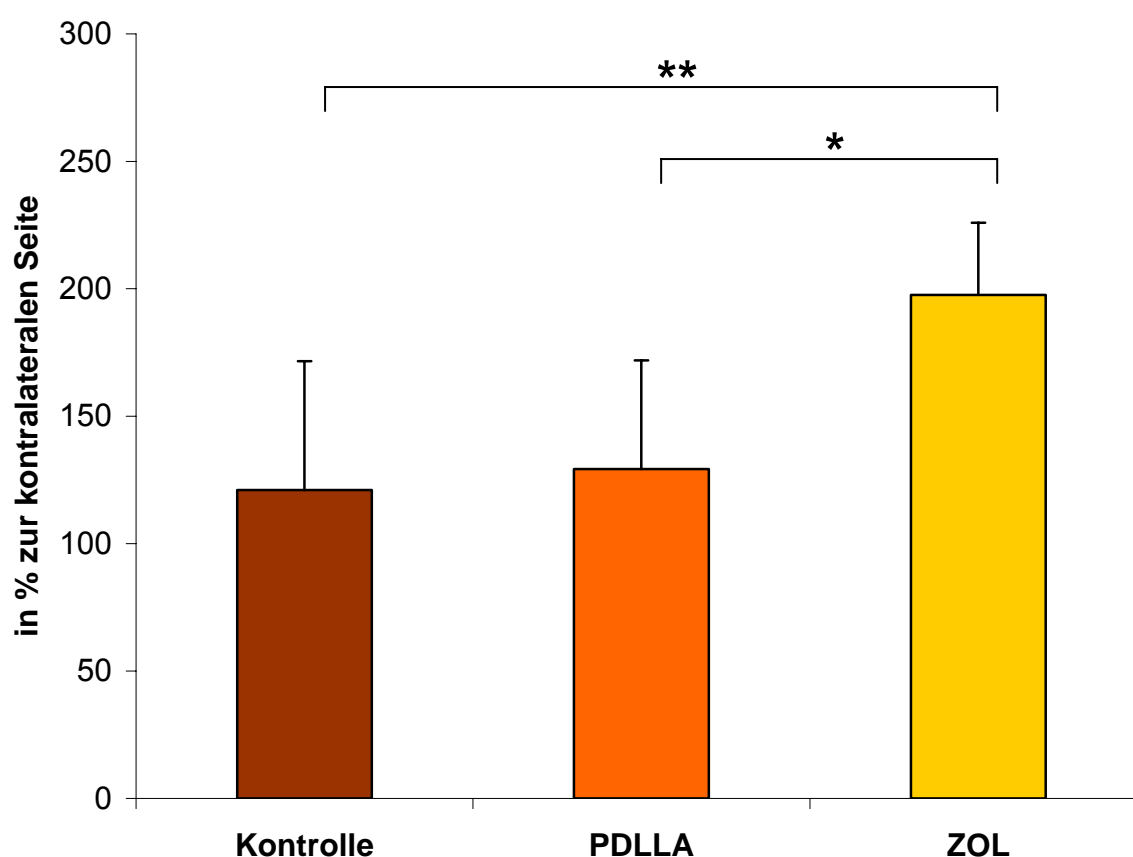


Abb. 10: Maximales Drehmoment der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 42 Tagen Standzeit; Mann-Whitney-U-Test: * $p = 0,012$ gegen PDLLA, ** $p = 0,012$ gegen Kontrolle; Kruskal-Wallis-Test $p = 0,012$; Bonferroni positiv

3.8.2. Maximale torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen Standzeit

Bei der Testung 42 Tage nach Operation wiesen die Tiere mit Zoledronat beschichteten Implantaten mit 185,2% ($\pm 37,8\%$) eine signifikant höhere maximale torsionale Steifigkeit auf (Abb. 10) als die Tiere mit PDLLA beschichteten Kirschner-Drähten (105,1% $\pm 36,8\%$) oder mit unbeschichteten Implantaten (79,3% $\pm 46,4\%$). Auch bei der maximalen torsionalen Steifigkeit ließ sich zwischen den Tieren der PDLLA-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied feststellen.

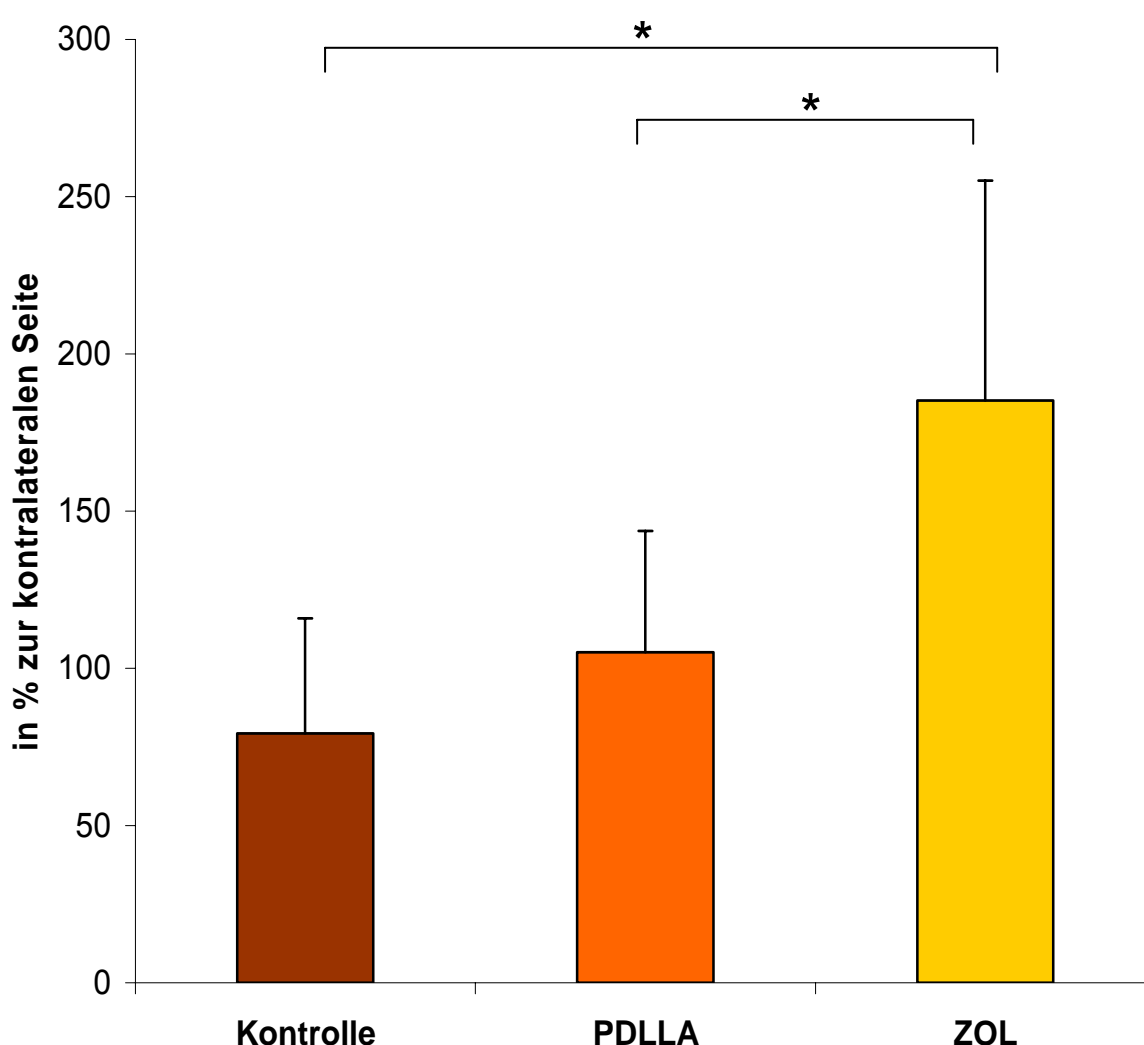


Abb. 11: Maximale torsionale Steifigkeit der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 42 Tagen Standzeit; Mann-Whitney-U-Test: * $p = 0,009$ gegen PDLLA, ** $p = 0,006$ gegen Kontrolle; Kruskal-Wallis-Test $p = 0,003$; Bonferroni positiv

3.8.3. Maximales Drehmoment nach 84 Tagen Standzeit

Nach 84 Tagen zeigten Tiere, die Implantate mit Zoledronat Beschichtung erhalten hatten, mit 210,8% ($\pm 36,1\%$) im Vergleich zur unfrakturierten Gegenseite einen erhöhten, aber nicht signifikanten Unterschied bezüglich des maximalen Drehmomentes (Abb. 11), bezogen auf die Tiere mit PDLLA beschichteten Kirschner-Drähten (174,0% $\pm 36,8\%$) oder mit unbeschichteten Implantaten (166,0% $\pm 27,6\%$). Zwischen den Tieren der PDLLA-Gruppe und der Kontrollgruppe bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

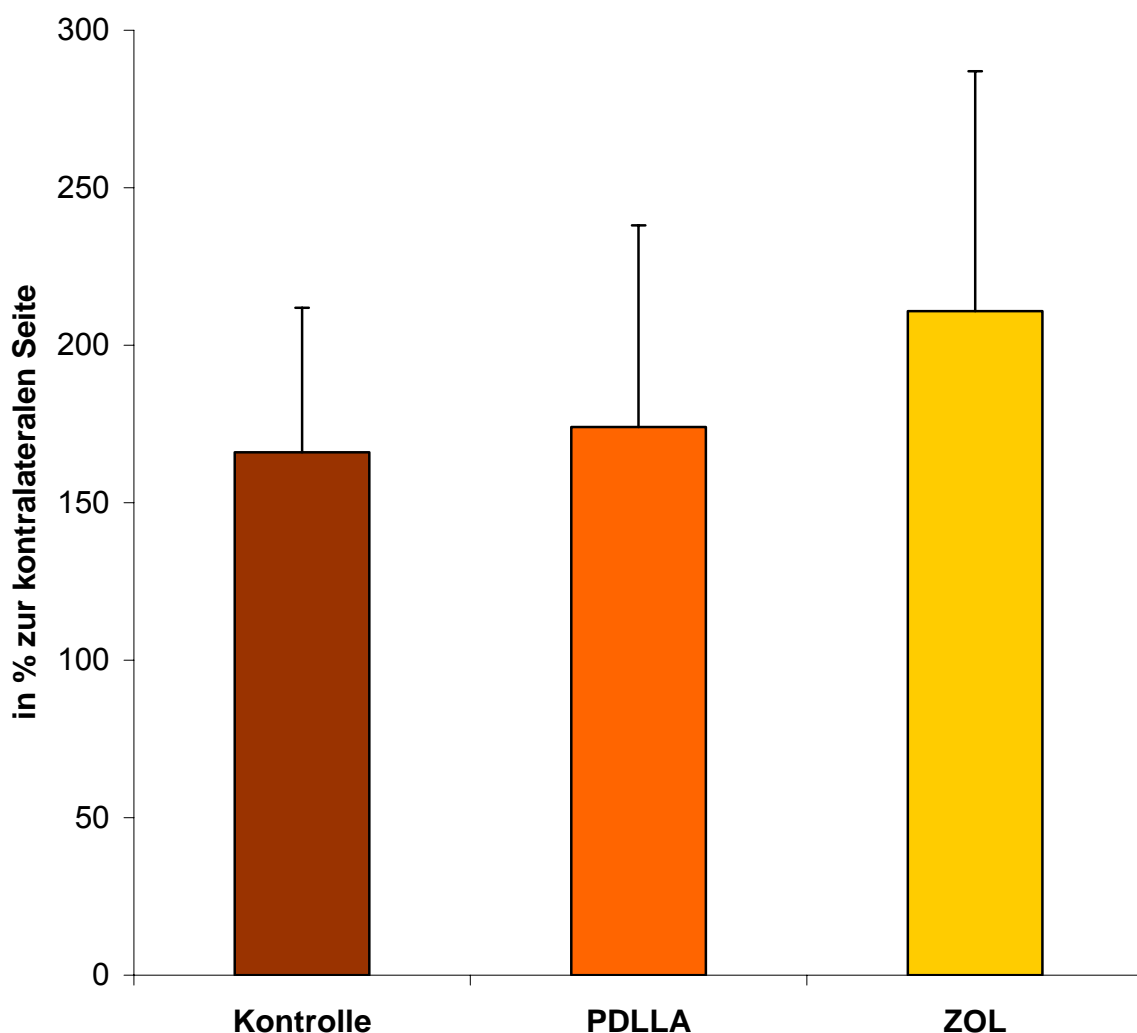


Abb. 12: Maximales Drehmoment der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 84 Tagen Standzeit; Kruskal-Wallis-Test $p = 0,283$

3.8.4. Maximale torsionale Steifigkeit nach 84 Tagen Standzeit

Hinsichtlich der maximalen torsionalen Steifigkeit (Abb. 12) wiesen die Tiere, deren frakturierte Tibiae mit Zoledronat beschichteten Implantaten versorgt worden waren, mit 179,5% ($\pm 33,9\%$) im Vergleich zur unfrakturierten Gegenseite nach 84 Tagen eine signifikant höhere torsionale Steifigkeit auf als die Tiere mit unbeschichteten Kirschner-Drähten (115,3% $\pm 34,5\%$). Gegenüber PDLLA beschichteten Implantaten (153,2% $\pm 35,2\%$) zeigte sich jedoch keine Signifikanz.

Zwischen den Tieren der PDLLA-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe bestand erneut kein signifikanter Unterschied.

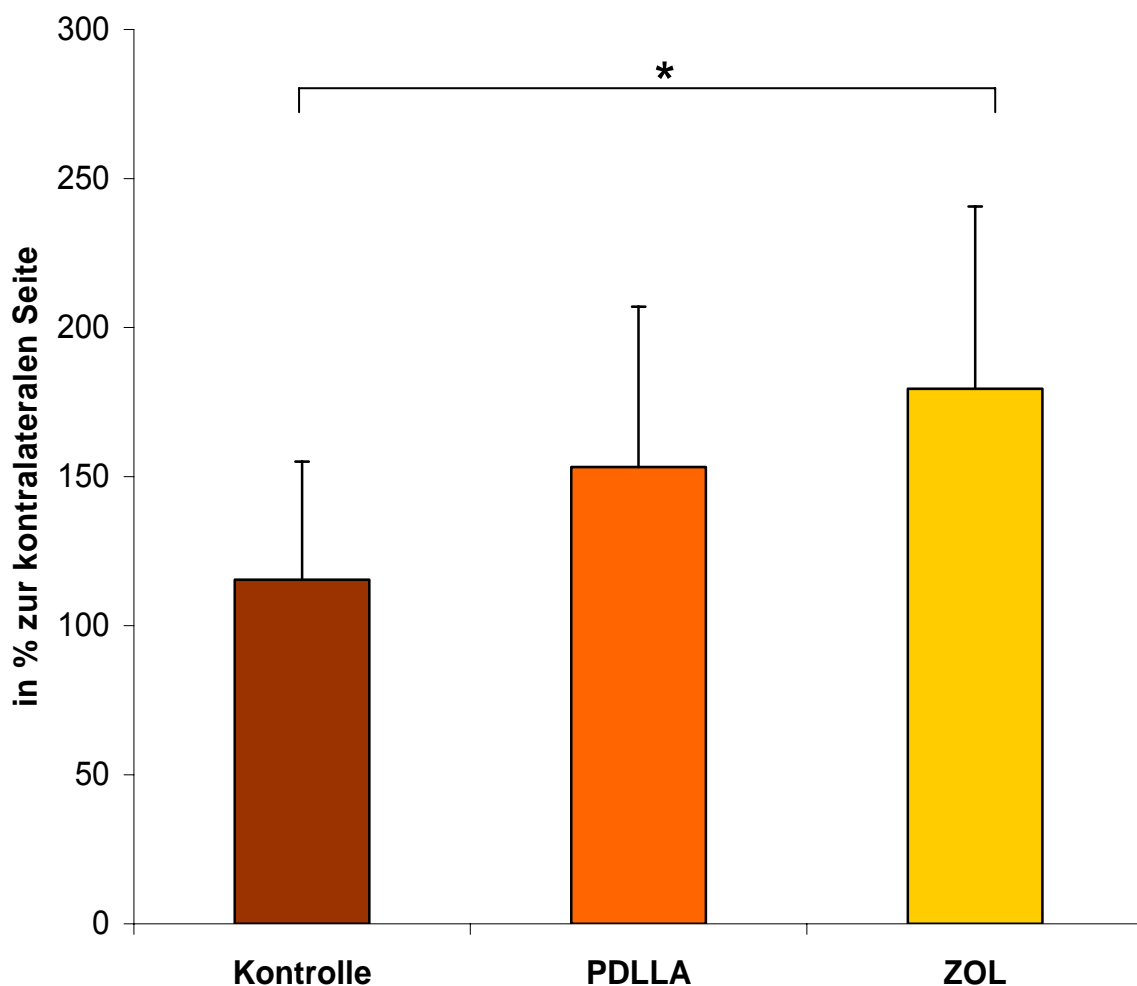


Abb. 13: Maximale torsionale Steifigkeit der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 84 Tagen Standzeit; Mann-Whitney-U-Test: * $p = 0,012$ gegen Kontrolle; Kruskal-Wallis-Test $p = 0,039$; Bonferroni positiv

3.8.5. Gegenüberstellung der Ergebnisse des maximalen Drehmoments

Bei einer zeitlichen Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Gruppen mit 42 und 84 Tagen Standzeit zeigte sich bezüglich des maximalen Drehmoments folgende Veränderung (Abb.13). Nachdem bei 42 Tagen das maximale Drehmoment der ZOL-Gruppe signifikant gegenüber den Gruppen mit PDLLA-Implantat und unbeschichtetem Draht erhöht war, stieg das maximale Drehmoment bei den beiden Vergleichsgruppen innerhalb der nächsten sechs Wochen um 34,6% (PDLLA-Gruppe; $p = 0,115$) bzw. 37,2% (Kontrollgruppe; $p = 0,068$) an.

Somit erreichten die Tiere der Vergleichsgruppen nach 84 Tagen annähernd die Werte der Tiere der ZOL-Gruppe nach 42 Tagen.

Da die ZOL-Gruppe hingegen im Vergleich zu den Ergebnissen bei 42 Tagen Standzeit nur um 6,7% ($p = 0,834$) gestiegen war, lag nach 84 Tagen insgesamt kein signifikant erhöhtes maximales Drehmoment gegenüber den Vergleichsgruppen vor.

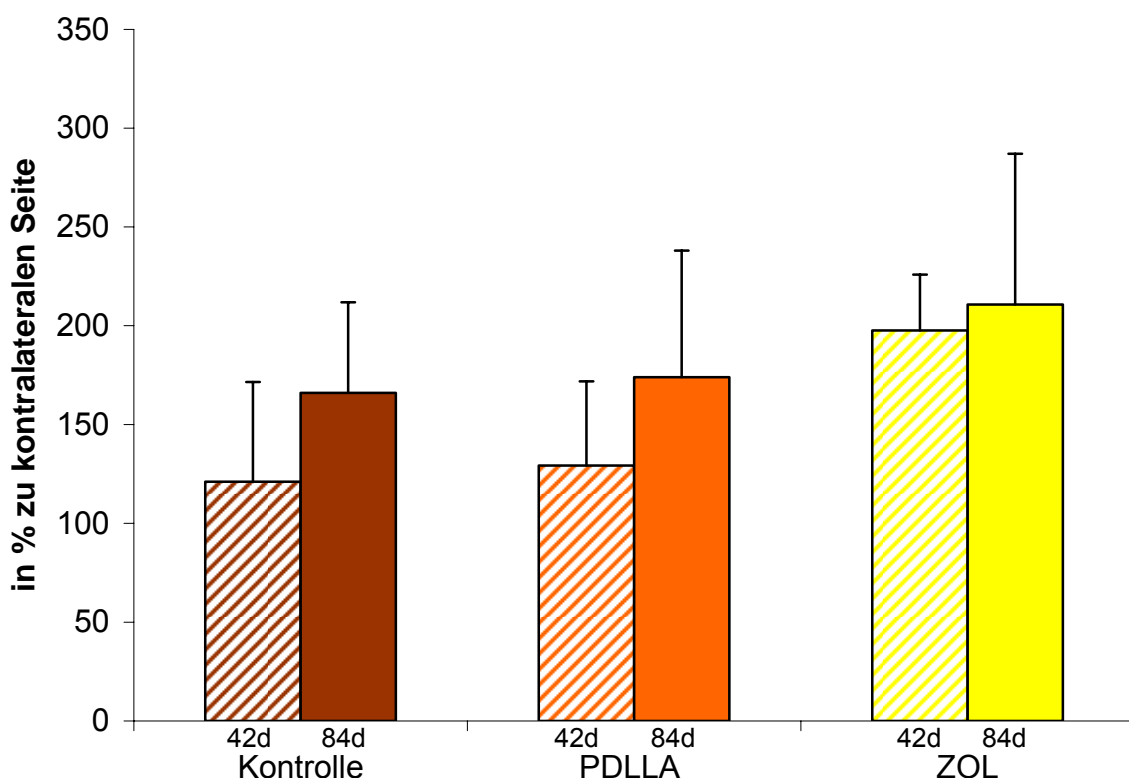


Abb. 14: Gegenüberstellung der Ergebnisse des maximalen Drehmoments nach 42 und 84 Tagen Standzeit; schraffierte Flächen: Werte bei 42 Tagen; ausgefüllte Flächen: Werte bei 84 Tagen

3.8.6. Gegenüberstellung der Ergebnisse der max. torsionalen Steifigkeit

Wenn man die Ergebnisse der maximalen torsionalen Steifigkeit der einzelnen Gruppen nach 42 und 84 Tagen Standzeit (Abb.14) gegenüberstellt, zeigte sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt, dass die Werte der ZOL-Gruppe signifikant gegenüber den Gruppen mit PDLLA-Implantat und unbeschichtetem Draht erhöht waren (s. 3.7.2 und 3.7.4.).

Während der kommenden sechs Wochen sank die maximale torsionale Steifigkeit der ZOL-Gruppe leicht um 3,1%.

Bei den beiden Vergleichsgruppen waren die Werte um 45,8% (PDLLA-Gruppe; $p = 0,046$) bzw. 45,4% (Kontrollgruppe; $p = 0,068$) deutlich angestiegen. Somit lag nach 84 Tagen nur noch eine signifikant erhöhte torsionale Steifigkeit im Vergleich der unbeschichteten Gruppe vor.

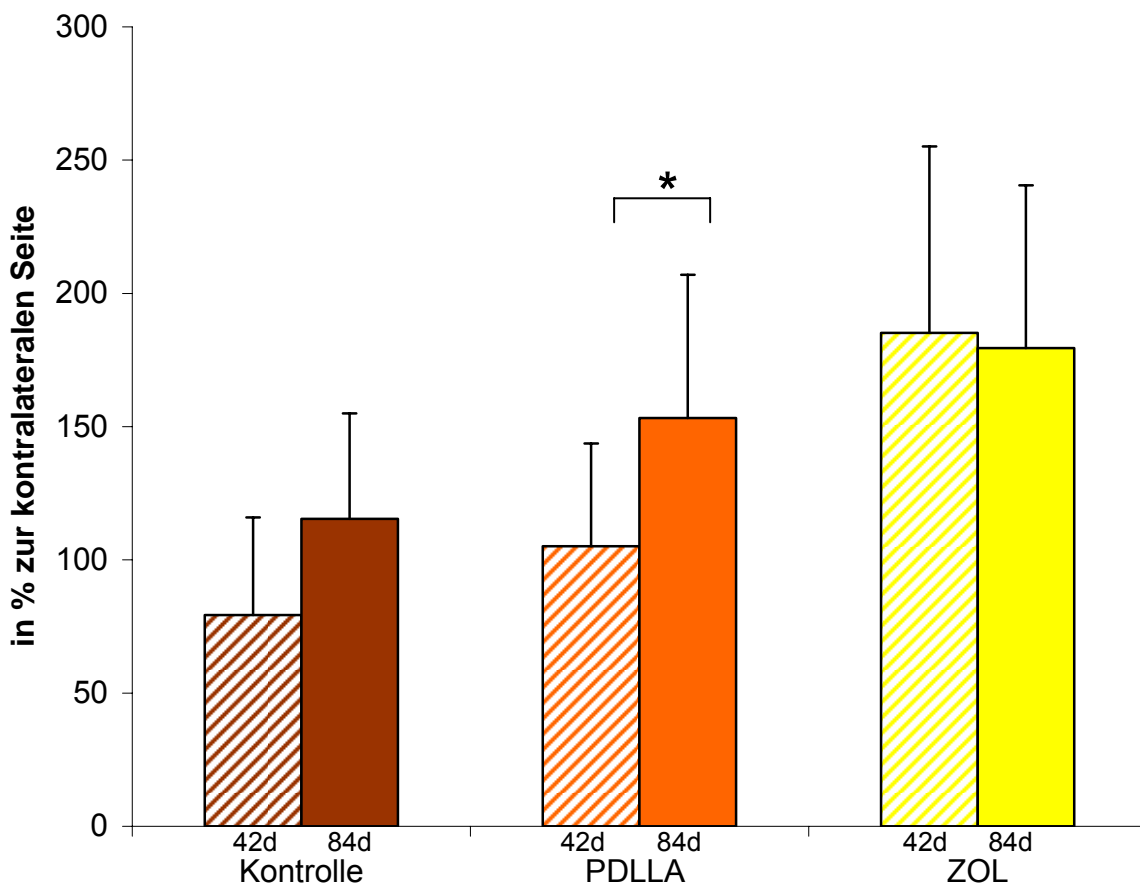


Abb. 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse der maximalen torsionalen Steifigkeit nach 42 und 84 Tagen Standzeit; * $p = 0,046$ gegen 42 Tage; schraffierte Flächen: Werte bei 42 Tagen; ausgefüllte Flächen: Werte bei 84 Tagen

3.9. Biomechanik-Kallusfläche-Korrelation

Um eine zusätzliche Aussage hinsichtlich einer Korrelation von biomechanischen und radiologischen Ergebnissen treffen zu können, wurde für die Zeitpunkte 42 und 84 Tage jeweils die Korrelation zwischen den biomechanischen Parametern und der berechneten mittleren Kallusfläche bestimmt.

Zwischen dem maximalen Drehmoment und der mittleren Kallusfläche (MKF) bestand nach 42 Tagen ein Korrelationskoeffizient von 0,583 ($p = 0,003$, zweiseitig), nach 84 Tagen ein Koeffizient von 0,584 ($p = 0,002$, zweiseitig). Diese Korrelationen waren auf dem 1%-Niveau signifikant.

Zwischen der torsionalen Steifigkeit und der MKF wurden mit einem Koeffizienten von 0,404 ($p = 0,05$, zweiseitig) bei 42 Tagen und einem Koeffizienten von 0,271 ($p = 0,190$, zweiseitig) bei 84 Tagen keine klar signifikanten Zusammenhänge angezeigt.

4. Diskussion

Der Einsatz von Bisphosphonaten bei der Knochenheilung ist ein zentraler Inhalt verschiedener Reviews und experimenteller wie klinischer Studien (^{1-4;20;26;44;45;47;55;60}). Ein Review von Fleisch (²⁰) behandelte in diesem Zusammenhang die Problematik bei in-vivo Experimenten, von histologischen auf biomechanische Eigenschaften zu schließen, da letztere bei Knochen von verschiedensten Faktoren wie Masse, dreidimensionaler Architektur, Mineralisation oder Matrixbeschaffenheit abhängen. Er kam zu dem Schluss, dass biomechanische Untersuchungen die beste Möglichkeit darstellten, den Effekt einer Substanz auf Knochen und Frakturheilung zu bestimmen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, die Wirkung von lokal aus einer Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung (PDLLA) appliziertem Zoledronat (ZOL) auf die Frakturheilung in einem Rattenmodell zu untersuchen. Hierzu wurde die Knochenstabilität mittels biomechanischer Testung an zwei Zeitpunkten nach dem Setzen einer Fraktur bestimmt.

In einem etablierten Frakturmodell (⁷⁴) wurde Sprague-Dawley-Ratten unter standardisierten Bedingungen die rechte Tibia gebrochen. Die dadurch erzielte Fraktur wurde mit unbeschichteten bzw. PDLLA- oder PDLLA/ZOL-beschichteten Titan-K-Drähten intramedullär stabilisiert. Am Operationstag und jeweils nach 14 Tagen in Folge wurden Röntgenbilder zum Heilungsverlauf angefertigt und das Befinden der Tiere durch Inspektion, Temperatur-, Gewicht- und Blutwertbestimmung kontrolliert. Nach 42 bzw. 84 Tagen wurden die Tiere getötet, die Knochen entnommen und in einer Torsionsmaschine bis zum Versagensbruch durch die konstante Kraft einer Materialprüfmaschine biomechanisch getestet. Hierbei wurden das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit bestimmt.

4.1. Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der Biomechanik zusammen mit der Auswertung der radiologischen Aufnahmen, dass es unter der lokalen Freisetzung von Zoledronat aus PDLLA zu einer beschleunigten Frakturheilung kam.

Bereits nach 28 Tagen zeichnete sich radiologisch unter Zoledronat-Gabe die Tendenz einer besseren Frakturkonsolidierung mit einer vermehrten Kallusüberbrückung und einer signifikanten Erhöhung von polarem Flächenträgheitsmoment und Kallusfläche ab. Letztere Parameter waren innerhalb der gesamten Standzeit nach 28 Tagen bei allen Gruppen am höchsten.

Nach 42 Tagen zeigten die biomechanischen und radiologischen Parameter der Knochen unter dem Einfluss von Zoledronat eine verstärkte Heilungstendenz. Radiologisch lag bei der ZOL-Gruppe eine signifikante Erhöhung bei Überbrückung, polarem Flächenträgheitsmoment und mittlerer Kallusfläche vor. Zusätzlich waren bei der biomechanischen Auswertung das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Als Zeichen einer verbesserten Frakturkonsolidierung wiesen Tibiae unter Zoledronat eine um 133,5% größere Steifigkeit und ein um 63,0% höheres Drehmoment gegenüber Knochen mit unbeschichteten Implantaten auf. Das maximale Drehmoment korrelierte signifikant mit der mittleren Kallusfläche.

Nach 84 Tagen hatten sich radiologisch die Überbrückungsverhältnisse angeglichen, dennoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Kallusfläche und des Flächenträgheitsmomentes in der ZOL-Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen. Hinsichtlich der biomechanischen Parameter konnten beim maximalen Drehmoment keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden und bei der torsionalen Steifigkeit bestand nur eine Signifikanz zwischen der ZOL-Gruppe zur Gruppe ohne Beschichtung. Insgesamt war hier das Drehmoment der ZOL-Gruppe fast konstant geblieben, während die Kontrollgruppen im Wert anstiegen und sich der ZOL-Gruppe stark annäherten. Bei der Steifigkeit war die ZOL-Gruppe ebenfalls nahezu gleich geblieben, während die Kontrollgruppen deutlich um fast 40% angestiegen waren. Es zeigte sich auch nach 84 Tagen eine signifikante Korrelation von maximalem Drehmoment und der mittleren Kallusfläche.

Bisphosphonate werden derzeit in der Klinik systemisch durch orale oder i.v. Gabe bei der Behandlung verschiedener Knochenerkrankungen (^{11;19;68;70}) eingesetzt. Die systemische Applikation von Bisphosphonaten hat verschiedene Nachteile gezeigt wie eine niedrige Bioverfügbarkeit (³³), Nebenwirkungen wie Fieber und grippeähnliche Symptome (^{53;86}), Magengeschwüre (¹⁷) und gastrointestinale Beschwerden oder leichte Anämien (⁴⁹), bei Zoledronat speziell ferner

Nierenfunktionsstörungen und deren Progredienz. Außerdem wurden in seltenen Fällen schwere Anämien, Thrombozytopenien, Leukopenien oder Panzytopenien beobachtet (Novartis).

In Anlehnung an die in der Klinik angewandte systemische Gabe, wurden BP in einigen früheren Studien zur Frakturheilung vor allem systemisch kontinuierlich oral⁽⁶⁰⁾ oder per Injektionem^(55;84), appliziert. Neuere Studien beschäftigten sich auch mit der lokalen Gabe von BP^(3;4).

Auch wenn präklinische Studien zur Gabe von BP bei der Frakturheilung bezüglich der verwendeten Tier-, Fraktur- und Applikationsmodelle, Bisphosphonate und Dosierungen sehr heterogen erschienen, zeigte sich im Trend, dass die Kallusgröße niemals abnahm, sondern stattdessen oft erhöht^(26;46;60;84;84) und stärker mineralisiert^(26;55) war. Eine systemische Gabe von BP zeigte im Hinblick auf die mechanische Frakturstabilität in vivo nur in einer Studie negative Ergebnisse zur verwendeten Kontrolle⁽⁸⁴⁾, sonst gleiche^(55;60) oder verbesserte biomechanische Werte^(3;4;26;45;47).

Die in der Literatur geschilderten Auswirkungen der BP-Applikation auf die Entwicklung von exponiertem Knochen und Frakturen zusammen mit den in-vitro Versuchen zur Wirkung einer PDLLA/ZOL-Beschichtung auf Osteoblasten und Osteoklasten^(28;29) führten zur Hypothese dieser Arbeit. Demnach könnte eine lokale Administration von Zoledronat aus PDLLA die Wiedererlangung der biomechanischen Stabilität nach Frakturen beschleunigen.

Nach Frakturen ist der betroffene Knochenabschnitt physiologischer Weise einem verstärkten Remodeling unterworfen, wobei Bisphosphonate vor allem durch ihre anti-katabole Wirkung auf Osteoklasten zu einem vergleichsweise höheren Knochenaufbau und größerem Kallus führen, als dies in einer physiologischen Situation der Fall ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vor dem Hintergrund der Literatur vermuten, dass die Frakturkonsolidierung durch die lokale Applikation von Zoledronat bereits in frühen Phasen beschleunigt wurde. Der Vorteil liegt hier wahrscheinlich in der zeitlich begrenzten Verzögerung und Reduktion des Remodelings. Versuche mit Knochentransplantaten haben darüber hinaus gezeigt, dass unter ZOL bestehender Knochen erhalten bleibt und durch neuen ergänzt wird⁽⁸²⁾. Bei der Einheilung orthopädischer Implantate reduzierte die lokale BP-Gabe die periprothetische

Knochenresorption (⁶). Dies führte histologisch zu einem Anstieg in der Retention neu geformten Knochens während der Revaskularisierung und des Remodelings, was auf einen positiven osteogenen Effekt schließen lässt (⁹⁴). Eine positive Wirkung von lokalem Zoledronat auf Osteoblasten konnten auch Greiner et al. bei in-vitro Versuchen beobachten (²⁸). Ferner zeigten ZOL-beschichtete Implantate bei osteoporotischen Ratten eine Stimulation der periprothetischen Knochenbildung und Erhöhung der biomechanischen Stabilität (⁵⁸).

Weiterhin könnte dies zu dem beobachteten größeren Kallus und damit zu der verstärkten biomechanischen Stabilität geführt haben (²⁶). Eine Theorie hierzu wäre, dass sich im zeitlichen Verlauf der Knochenumbau nach der Verminderung des lokalen Zoledronat wieder normalisieren und der frühe in den reifen Kallus überführt werden würde. Damit wäre ein Anstieg biomechanischer Stabilität des frakturierten Knochens möglich. Nach Abbau und Resorption des Zoledronat und einem gleichmäßigen Umbau des Kallus in allen Gruppen müsste es dann nach 84 Tagen zu einer langsamen Angleichung der biomechanischen Werte kommen.

Diese Annahme wird unterstützt durch die hier vorliegenden Ergebnisse, nach denen die Knochen der Frakturseite nach 84 Tagen bei allen Gruppen deutlich belastbarer waren als die Gegenseite, was sich in Werten über 100% widerspiegelte. Der Grund liegt hierbei wahrscheinlich in einer generellen reaktiven Überproduktion von Kollagen und erhöhter Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten nach einer Fraktur. Um eine letztliche Angleichung der Werte zu untersuchen, werden allerdings noch Langzeitversuche nötig sein.

Die bleibenden Signifikanzen bei der Kallusfläche liegen wohl an der initialen Kallusvergrößerung unter Zoledronat und dem anschließend gleichmäßigen Umbau in allen Gruppen. Im Verlauf nahm die Kallusfläche von 28 Tagen zu 42 und 84 Tagen zwar in allen Gruppen ab (s. 3.3.). Der anfangs durch Zoledronat bedingte vermehrte Aufbau von Knochenmasse schien jedoch den dauerhaft signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zu begründen.

Auf Zellebene könnte ferner eine Hypothese von Plotkin et al. ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen biomechanischen Ergebnisse sein. Hiernach haben neben Osteoblasten und Osteoklasten auch Osteozyten (als ausdifferenzierte Osteoblasten) eine entscheidende Signalwirkung in der Knochenmatrix bei der Reparatur von Knochendefekten. Bei ihrem Zelltod käme es demnach zur Akkumulation von Mikro-Schäden und einer damit gesteigerten

Knochenfragilität. Eine in-vitro gezeigte potentiell protektive Wirkung der BP auf Osteoblasten könnte somit die Funktion der ausdifferenzierten Osteozyten bewahren und zum anderen die Aktivitätsdauer der Osteoblasten verlängern, was zu einem Anstieg der trabekulären Stärke führen würde (⁶³).

Die biomechanischen Ergebnisse dieser Dissertation stehen im Gegensatz zu einer Studie von Amanat et al. (³) an einem Ratten-Osteotomie-Modell. Hierbei verbesserte eine einzelne perioperative systemische Dosis Pamidronat (PAM) die biomechanische Stabilität signifikant, während aus einer Beschichtung freigesetztes lokales PAM keinen signifikanten Effekt zeigte und in hoher Dosis zu einer leicht erhöhten Pseudarthrosen-Rate führte. Ein Vergleich der Daten ist jedoch letztlich schwierig, da Unterschiede bestanden bzgl. der untersuchten Medikamente (PAM vs. ZOL), des Tiermodells (offene Osteotomie vs. geschlossene Fraktur), der verwendeten Dosis (0.1mg bzw. 1.0mg vs. 50µg) und der Knochen (Femur vs. Tibia). Ferner wurde bei der Applikation ein Poly-(L-Laktid) als Trägersubstanz verwendet und auf einer Stelle des implantierten K-Drahtes aufgetragen, die einen geringeren Durchmesser hatte als der übrige Draht. Es könnte daher möglich sein, dass der Knochen an der Freisetzungsstelle nicht in direktem Kontakt zum Implantat stand, was einerseits die Wirkstoffdistribution beeinflusst haben, andererseits zu einer mangelnden Stabilisierung geführt haben mag.

In einer anderen Studie der gleichen Arbeitsgruppe zeigte eine einmalige systemische Gabe von Zoledronat eine bzw. zwei Wochen nach einer Fraktur eine deutlich höhere Stabilität gegenüber einer lokalen intraoperativen Dosis (⁴). Im Gegensatz zur früheren Studie mit Pamidronat wurde das nun verwendete Bisphosphonat Zoledronat jedoch in die Frakturregion injiziert. Auch wenn bei der zweiten Studie ein Frakturmodell verwendet wurde, wurden die Knochen hierbei mit K-Drähten vorstabilisiert. Vor allem aber muss die Applikationsart kritisch beurteilt werden. Die mögliche Wirkungsdauer einer Substanz ist durch die Einarbeitung in einen biodegradierbaren Materialträger nachhaltiger, da die Dosis über einen längeren Zeitraum abgegeben wird als bei einer einmaligen Injektion, bei der die Wirkung auf eine viel kürzere Zeit limitiert ist.

In einer anderen Studie wurde bei einem Osteotomiemodell an Schafen mit prä- und postoperativer Gabe von Pamidronat gezeigt, dass BP den Kallusumbau reduzieren,

was in einem gesteigerten Kallusvolumen mit Mineralgehaltanstieg und damit einem signifikanten Anstieg in der torsionalen Stärke resultierte (²⁶).

Ferner zeigten Li et al. beim Effekt von Incadronat auf die Frakturheilung, dass sich der Knochenumbau bei einer kurzen zweiwöchigen Vorbehandlung laut histologischer Analyse normalisierte und bei kontinuierlicher Zuführung während der ganzen Heilungsphase verzögert war (^{46;47}). Diese Hypothese kann durch die Beobachtungen zur Entwicklung der Kallusfläche in dieser Studie gestützt werden.

Da bei systemischer Gabe von BP - wie oben erwähnt - oft signifikante Einflüsse auf die Knochenstabilität beobachtet wurden, kann man vermuten, dass ein bislang eingeschränkter Nutzen lokaler Applikation zumindest teilweise auf die Höhe der applizierten Dosen zurück geführt werden kann. Eine Dosisabhängigkeit der Wirkung von BP auf Knochenzellen haben einige Autoren bereits beschrieben (^{12;20}), wobei diese durch eine richtige Konzentration optimiert werden könnte. In-vitro Versuche von Greiner et al. zeigten, dass eine lokale Konzentration von 50µg Zoledronat die beste Wirkung auf eine Förderung von Osteoblasten und eine Hemmung von Osteoklasten haben (^{28;29}). Da in-vitro Ergebnisse nicht direkt auf die komplexe Situation im lebenden Knochen übertragen werden können, wäre es ratsam, eine Dosisfindungsstudie in vivo nachzuholen. Die Knochenregeneration nach einer Fraktur war bei einer Beschichtung mit Zoledronat in der hier verwendeten Dosis sowohl bei Kallusbildung und radiologischer Überbrückung als auch hinsichtlich der Wiedererlangung biomechanischer Stabilität beschleunigt.

4.2. Diskussion von Material und Methoden

Der Vorteil des verwendeten Frakturmodells lag in der hohen Realitätsnähe. In der Literatur sind zur Erforschung der Frakturheilung bereits andere Versuchsanordnungen beschrieben worden. So wurden geschlossene Frakturen durch spezielle Zangen (⁵⁶) hervorgerufen, jedoch ohne Standardisierung der Durchführung. Definierte Knochenunterbrechungen dagegen wurden durch eine Osteotomie (^{26;26;47}) gesetzt, was aber keine Simulation eines Unfallmechanismus darstellte.

Auch guillotinenähnliche Frakturmaschinen sind bereits beschrieben worden (⁸). Doch wurden hier die stabilisierenden Nägel - teilweise minimal-invasiv retrograd - vor Fraktur eingebracht (^{4;5;26;41;55;84}). Diese Vorgehensweise vollzieht den Unfallhergang jedoch nicht realistisch nach und birgt zum anderen die Gefahr einer

Verbiegung des Kraftträgers. Im Vergleich dazu ist die Realitätsnähe bei dem hier verwendeten Frakturmodell durch die Möglichkeit der standardisierten Fraktur und die erst posttraumatisch erfolgende intramedulläre Schienung besser gewahrt.

Die Prüfung der verwendeten Torsionsmaschine zeigte eine hohe Reliabilität und damit eine hohe Replizierbarkeit der erbrachten Ergebnisse. Mit einer Vorlast sollten Wertaberrationen durch torsionsbedingte Längenänderungen der Knochen minimiert werden. Im Gegensatz zu Verfahren mit Biegebelastung wird bei der torsionalen Testung die aufgewendete Kraft gleichmäßig auf den gesamten Knochen übertragen und bewirkt einen Versagensbruch an der tatsächlich schwächsten Stelle ⁽⁸⁾. Da 4-Punktbiegungstests in der Regel nur bei Großtierknochen anwendbar sind ⁽⁶⁰⁾, verwendeten andere Studien bei Kleintierknochen 3-Punktbiegungstests ^(45;84), bei denen ein Knochen proximal und distal auf zwei Leisten gelegt und durch einen Stempel mittig bis zur Fraktur belastet wurde. Hierbei könnten jedoch unterschiedliche Kortikalisstärken oder Linearitätsunterschiede des Knochens die Ergebniserhebung verfälschen. Die verwendete Torsionsmaschine kann Untersuchungen von Kleintier-Knochen standardisiert bei hoher Reliabilität durchführen und biomechanische Auswirkungen verschiedenster Wirkstoffapplikationen erfassen ^(75;77;90).

Das eingesetzte PDLLA wurde bereits in anderen Studien auf seine Beschaffenheit und Verwendbarkeit als Trägermaterial getestet und schon in klinischer Anwendung erprobt ⁽⁷⁵⁾. Ein Vorteil ist seine vollständige biologische Abbaubarkeit. Außerdem können Osteosynthese-Materialien ohne Veränderung ihrer Struktur durch ein kaltes Beschichtungsverfahren mit PDLLA als Träger beschichtet werden. Die Freisetzung von in PDLLA eingearbeiteten Wirkstoffen durch Diffusion und enzymatische Abbauvorgänge wurde bereits in früheren Studien mit den Substanzen IGF-1 oder TGF- β 1 quantifiziert ⁽⁷⁸⁾.

Ein weiterer Vorteil der PDLLA-Beschichtung zeigt sich gegenüber anderen Applikationsmethoden. So besteht beim intraoperativen manuellen Auftropfen von Bisphosphonaten auf die Wirkstelle ⁽⁸¹⁾ beim bekannten engen Wirkungsfenster eher die Gefahr, eine lokal schädliche Konzentration zu erzeugen. Ähnliche Probleme bestünden auch beim Einbringen von beschichteten Granula ⁽⁷⁹⁾ mit der zusätzlichen

Gefahr einer ektopischen Verlagerung. In der Literatur findet man ferner andere Applikationsmethoden im Rahmen der Frakturheilung wie die von BMP-2 mittels Kollagenschwämmen, bei der die Gefahr von Eiweiß-Abstoßungs-Reaktionen⁽⁸³⁾ bestehen bleibt. Das gleich gilt für Katheter- und Injektionsapplikationen von Wachstumsfaktoren in den Frakturbereich^(35;54), welche eine latente Infektionsquelle darstellen.

Eine Schwierigkeit im Versuchsaufbau stellte das Fehlen einer gängigen Quantifizierung der Freisetzung von Zoledronat dar, so dass es nicht möglich war, zuverlässig die Menge der freigesetzten Substanz zu bestimmen.

Nur wenige Studien untersuchten bisher den Effekt lokaler Frakturbehandlung mit Bisphosphonaten^(3;4). Keine dieser Studien konnte die Menge der freigesetzten Substanz im jeweiligen Medium oder Knochen evaluieren. Lediglich eine Studie, die erst kürzlich veröffentlicht wurde, untersuchte die Aufnahme von C¹⁴-markiertem Zoledronat in den Kallus⁽⁴⁾.

Bei vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben in-vitro Elutionsversuche für die Substanzen IGF-1 und TGF-β1 gezeigt, dass 54% des IGF-1 und 48% des TGF-β1 innerhalb der ersten 48 Stunden aus der PDLLA-Matrix freigesetzt werden⁽⁷⁸⁾. Diesem anfänglichen Maximum folgte eine kontinuierliche Freisetzung, bis nach 42 Tagen über 70% der Stoffe gelöst waren. In Verbindung mit den beobachteten in-vitro Ergebnissen der ZOL-Freisetzung aus PDLLA könnte vermutet werden, dass die Freisetzung von ZOL einer ähnlichen Kinetik unterliegt.

Hinsichtlich potentieller systemischer Nebenwirkungen wurden im Versuchsverlauf Temperatur-, Gewichts-, Serum- und Blutwerte von Tieren bestimmt. Im gesamten Studienverlauf lieferten diese Werte jedoch keine Hinweise auf signifikante Veränderungen bei den Tieren, die mit systemischen Nebenwirkungen der applizierten Beschichtungen assoziiert werden konnten, auch das Allgemeinbefinden der Tiere erschien ungestört.

Kritisch zu bewerten ist, dass auch an dieser vorliegenden Arbeit keine in-vivo oder in-vitro Kinetik von Zoledronat aus PDLLA demonstriert wurde. Schlussfolgerungen hinsichtlich einer zeitlichen Freisetzung von Zoledronat erfolgten daher indirekt und somit nur über die Ergebnisse der biomechanischen und radiologischen Untersuchungen (d.h. aus dessen biologischer Wirkung auf den umgebenden

Knochen) sowie aus Erkenntnissen früherer Freisetzungskinetiken von biologisch wirksamen Stoffen aus der PDLLA-Trägermatrix. Das Fehlen einer in-vivo Detektion von Zoledronat oder dessen potentiellen biologisch wirksamen Metaboliten lässt zudem keine gesicherten Aussagen über die Wirkung von Zoledronat an anderen Stellen des Knochenapparates zu.

Um detailliertere Aussagen über mögliche Veränderungen durch lokales Zoledronat während der Frakturheilung treffen zu können, sind derzeit weitere histologische Untersuchungen initiiert, die aber nicht Teil dieser Dissertation sind.

Kritisch ist schließlich auch die Methodik zur Berechnung der Kallusmaße zu sehen. Da das Zentimetermaß, das dem verarbeitenden Computerprogramm als Referenz diente, erst nach Anfertigung der Röntgenbilder hinzugefügt wurde, bot dies die Möglichkeit für Abweichungen und Messungenauigkeiten. Beim Versuchsaufbau wurde probiert, diese durch Validierung an Hand der bekannten Implantatmaße so gering wie möglich zu halten. Auch wenn die manuelle Berechnung der Kallusfläche bereits in der Literatur Verwendung fand (⁶⁶), hätte eine μ CT-Ermittlung, die leider nicht zur Verfügung stand, eine viel höhere Genauigkeit geliefert. Die Ergebnisse können somit wegen der zu erwartenden Messgenauigkeiten letztlich nur als Hinweis auf mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen gesehen werden.

4.3. Klinische Relevanz und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte die in der Einleitung aufgestellte Hypothese bestätigt werden. An einem Rattenfrakturmodell konnte gezeigt werden, dass es durch die lokale Applikation des Bisphosphonat Zoledronat aus einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung (PDLLA) zu einer früheren biomechanischen Belastbarkeit frakturierter Knochen kommt.

Aus den bekannten positiven Erfahrungen mit systemischen BP bei Frakturen in der Klinik (^{2:50}), den Ergebnissen von experimentellen Studien zur Gabe von BP bei Frakturheilung (^{3:45;47}) an Tieren und den in-vitro Ergebnissen von Zoledronat auf Knochenzellen (^{28:29}), lassen sich durch die biomechanischen Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise für denkbare Vorteile einer klinischen Anwendung ableiten. Auch bei

Menschen könnte der Heilungsverlauf von Frakturen durch lokale Applikation von BP aus einer Implantatbeschichtung mit PDLLA beschleunigt werden.

Frakturen betreffen als Folge von Unfällen heutzutage trotz verbesserter Sicherheitsvorkehrungen immer noch tausende von Menschen. Die für die Genesung der Patienten erforderliche Wiedererlangung der biologischen Stabilität und Vitalität des Knochens wird durch viele Einflüsse gefährdet und trotz Einsatz modernster Therapiekonzepte und Materialien kommt es immer noch zu Verzögerungen im Heilungsverlauf. Durch verlängerte Krankenhausliegezeiten ist der einzelne Patient auch höheren Risiken ausgesetzt, Infektionen oder Thrombosen und in deren Folge Embolien zu erleiden. Zusätzlich entsteht eine hohe volkswirtschaftliche Belastung durch die medizinischen und sozioökonomischen Kosten, die durch die Behandlung anfallen. Für das Wohl des Einzelnen wie auch der Gemeinschaft wäre eine beschleunigte und erfolgreiche Frakturheilung somit erstrebenswert.

Patienten könnten früher aus dem Krankenhaus entlassen werden, was deren Lebensqualität verbessern und gleichzeitig das Risiko von Aufenthalt bedingten sekundären Erkrankungen mindern würde. Es wäre außerdem anzunehmen, dass die Nebenwirkungen von Zoledronat bei systemischer Applikation wie grippeähnliche Symptome, gastrointestinale Nebenwirkungen, Nierenfunktionsstörungen oder Blutbildveränderungen durch die lokale Gabe stark reduziert oder vielleicht sogar vollkommen vermieden werden könnten.

Zusätzlich könnte eine klinische Nutzung von BP zur Stimulation der Knochenheilung erheblich schneller erfolgen, als bei anderen experimentell verwendeten Substanzen wie IGF-1 oder TGF- β 1, da es sich bei den Bisphosphonaten um klinisch bereits zugelassene und erprobte Medikamente handelt. Die lokale Freisetzung kann durch die verwendete PDLLA-Beschichtung (⁷⁸) in Ergänzung der ursprünglich stabilisierenden und formerhaltenden Funktion von Implantaten in definierten Mengen erfolgen, die über eine einmalige initiale Dosis hinausgehen.

Als Ausblick bleibt zu vermerken, dass zum weiteren Verständnis der genauen Vorgänge histologische Untersuchungen des vorliegenden Modells durchgeführt werden. Ferner sollten die genauen Mechanismen der Wirkung von Bisphosphonaten auf zellulärer Ebene in den kommenden Jahren weiter untersucht

werden. Ein verstärktes Augenmerk sollte dabei der dosisabhängigen Wirkung von BP auf die verschiedenen Knochenzellen in einer in-vivo Situation gelten. Dies würde auch ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen Freisetzungs- und Pharmakokinetik und daraus resultierenden Nebenwirkungen beinhalten. Für die lokale Applikation von BP sollten noch Langzeitstudien durchgeführt werden, um eine Entwicklung und eventuell vollständige Angleichung der Knochenparameter und Knocheneigenschaften unter dem Einfluss von Zoledronat beschichteten Implantaten zu detektieren. Diese Studien wären zu ergänzen von Versuchen auf Großtierebene, bevor ein Einsatz bei Menschen zu erwägen wäre.

5. Zusammenfassung

Das Bisphosphonat Zoledronat (ZOL) wird gegenwärtig zur Behandlung von Tumor assoziierter Hyperkalzämie, Knochenmetastasen und Osteoporose eingesetzt. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass Zoledronat die Aktivität von Osteoklasten hemmt und die der Osteoblasten in-vitro positiv beeinflusst. Diese Eigenschaften könnten sich vorteilhaft auf die Behandlung von Frakturen durch eine lokale Applikation auswirken.

Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation war, ob es unter lokaler Applikation des Bisphosphonat Zoledronat aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Implantatbeschichtung zu einer früheren und verbesserten Frakturheilung und biomechanischen Stabilität kommt. An einem Rattenfrakturmodell wurde eine Applikationsdosis von 50µM Zoledronat untersucht.

Die radiologische Auswertung zeigte signifikant erhöhte Frakturkonsolidierungen der ZOL-Gruppe bei 42 Tagen ohne signifikante Unterschiede zu Vergleichsgruppen bei 28 und 84 Tagen. Die Kallusfläche wie auch das polare Flächenträgheitsmoment waren zu allen Zeitpunkten in der ZOL-Gruppe signifikant erhöht.

Bei der biomechanischen Testung waren nach 42 Tagen das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit in der ZOL-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht. Während nach 84 Tagen das maximale Drehmoment der Kontrollgruppen die Werte der ZOL-Gruppe erreichte, blieb die torsionale Steifigkeit der ZOL-Gruppe signifikant erhöht gegenüber der Gruppe ohne Beschichtung.

Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass die lokale Applikation von Zoledronat aus einer PDLLA-Beschichtung das Wiedererlangen biomechanischer Stabilität nach Fraktur beschleunigen und verbessern kann. In dieser Studie konnten keine systemischen Nebenwirkungen durch die lokale Applikation von PDLLA oder Zoledronat beobachtet werden.

Der Einsatz von Bisphosphonaten bei der Frakturheilung ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Diese Studie liefert Hinweise darauf, dass bei der möglichen Behandlung von Frakturen in Zukunft die lokale Anwendung von Zoledronat als Alternative zu einer systemischen Applikation in Betracht gezogen werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Adachi, J. D., Saag, K. G., Delmas, P. D., et al.: Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum.* 44:202-211, 2001.
2. Adolphson, P., Abbaszadegan, H., Boden, H., et al.: Clodronate increases mineralization of callus after Colles' fracture: a randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective trial in 32 patients. *Acta Orthop. Scand.* 71:195-200, 2000.
3. Amanat, N., Brown, R., Bilston, L. E., et al.: A single systemic dose of pamidronate improves bone mineral content and accelerates restoration of strength in a rat model of fracture repair. *J. Orthop. Res.* 23:1029-1034, 2005.
4. Amanat, N., McDonald, M., Godfrey, C., et al.: Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner. Res.* 22:867-876, 2007.
5. Aro, H. T., Wippermann, B. W., Hodgson, et al.: Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J. Orthop. Res.* 8:238-246, 1990.
6. Astrand, J. and Aspenberg, P.: Topical, single dose bisphosphonate treatment reduced bone resorption in a rat model for prosthetic loosening. *J. Orthop. Res.* 22:244-249, 2004.
7. Blomen, L.J.M.J.: History of the bisphosphonates: Discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates. In: Bijvoet, O.L.M., Fleisch, H.A., Canfield, R.E., Russell, R.G.G. (eds.), *Bisphosphonate on Bones*. Amsterdam, Holland: Elsevier, 111-124, 1995.
8. Bonnarens, F. and Einhorn, T. A.: Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J. Orthop. Res.* 2:97-101, 1984.
9. Bransford, R., Goergens, E., Briody, J., et al.: Effect of zoledronic acid in an L6-L7 rabbit spine fusion model. *Eur. Spine J.* 2006.
10. Brinker, M. R. and O'Connor, D. P.: The incidence of fractures and dislocations referred for orthopaedic services in a capitated population. *J Bone Joint Surg Am.* 86-A:290-297, 2004.
11. Buckler, H., Fraser, W., Hosking, D., et al.: Single infusion of zoledronate in Paget's disease of bone: a placebo-controlled, dose-ranging study. *Bone.* 24:81S-85S, 1999.
12. Carano, A., Teitelbaum, S. L., Konsek, J. D., et al.: Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest.* 85:456-461, 1990.

13. Coxon, F. P., Thompson, K., and Rogers, M. J.: Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6:307-312, 2006.
14. D'Aoust, P., McCulloch, C. A., Tenenbaum, H. C., et al.: Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. *Cell Tissue Res.* 302:353-363, 2000.
15. Ebetino, F.H., Francis, M.D., Rogers, M.J., et al.: Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 9:233-243, 1998.
16. Einhorn, T. A.: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 77:940-956, 1995.
17. Elliott, S. N., McKnight, W., Davies, N. M., et al.: Alendronate induces gastric injury and delays ulcer healing in rodents. *Life Sci.* 62:77-91, 1998.
18. Flanagan, A. M. and Chambers, T. J.: Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. *Calcif. Tissue Int.* 49:407-415, 1991.
19. Fleisch H: Bisphosphonates in bone disease: From the laboratory to the patient. 2nd ed., New York/London, The Parthenon Publishing Group, 1995.
20. Fleisch, H.: Can bisphosphonates be given to patients with fractures? *J Bone Miner. Res.* 16:437-440, 2001.
21. Frith, J. C., Monkkonen, J., Auriola, S., et al.: The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum.* 44:2201-2210, 2001.
22. Fromiguet, O. and Body, J. J.: Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest.* 25:539-546, 2002.
23. Gesellschaft für Versuchstierkunde und Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren 1999. (Accessed August 8, 2007, at <http://www.tierschutz-tvt.de/merkblatt74.pdf>)
24. Giuliani, N., Pedrazzoni, M., Negri, G., et al.: Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone.* 22:455-461, 1998.
25. Gomberg, B. F., Gruen, G. S., Smith, W. R., et al.: Outcomes in acute orthopaedic trauma: a review of 130,506 patients by age. *Injury.* 30:431-437, 1999.

26. Goodship, A. E., Walker, P. C., McNally, D., et al.: Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. *Ann. Oncol.* 5 Suppl 7:S53-S55, 1994.
27. Göpferich A.: Bioresorbable polymers as drug delivery systems. In Walenkamp G. (ed.), *Biomaterials in surgery*. Stuttgart/New York, Thieme Verlag, 1998.
28. Greiner, S., Kadow-Romacker, A., Lubberstedt, M., et al.: The effect of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating on osteoblasts in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 80:769-775, 2007.
29. Greiner, S., Kadow-Romacker, A., Wildemann, B., et al.: Bisphosphonates incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating inhibit osteoclast like cells in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2007.
30. Gutta, R. and Louis, P. J.: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 104:186-193, 2007.
31. Hofbauer, L. C., Gori, F., Riggs, B. L., et al.: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 140:4382-4389, 1999.
32. Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., et al.: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:3540-3545, 1999.
33. Hyldstrup, L., Flesch, G., and Hauffe, S. A.: Pharmacokinetic evaluation of pamidronate after oral administration: a study on dose proportionality, absolute bioavailability, and effect of repeated administration. *Calcif. Tissue Int.* 53:297-300, 1993.
34. Inaugural Meeting of "The Bone and Joint Decade 2000–2010", 17 and 18 April 1998, Consensus Document, Lund, Sweden (Accessed July 19, 2007, at www.boneandjointdecade.org)
35. Isgaard, J., Nilsson, A., Lindahl, A., et al.: Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am. J. Physiol.* 250:E367-E372, 1986.
36. Ito, M., Amizuka, N., Nakajima, T., et al.: Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone.* 25:447-452, 1999.
37. Ito, M., Chokki, M., Ogino, Y., et al.: Comparison of cytotoxic effects of bisphosphonates in vitro and in vivo. *Calcif. Tissue Int.* 63:143-147, 1998.
38. Jakobsen, T., Kold, S., Bechtold, J. E., et al.: Effect of topical alendronate treatment on fixation of implants inserted with bone compaction. *Clin Orthop. Relat Res.* 444:229-234, 2006.

39. Jung, A., Bisaz, S., and Fleisch, H.: The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif. Tissue Res.* 11:269-280, 1973.
40. Kavanagh, K. L., Guo, K., Dunford, J. E., et al.: The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7829-7834, 2006.
41. Koivukangas, A., Tuukkanen, J., Kippo, K., et al.: Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. *Clin. Orthop. Relat Res.* 268-278, 2003.
42. Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., et al.: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 397:315-323, 1999.
43. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., et al: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93:165-176, 1998.
44. Lenehan, T. M., Balligand, M., Nunamaker, D. M., et al.: Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J. Orthop. Res.* 3:499-507, 1985.
45. Li, C., Mori, S., Li, J., et al.: Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J. Bone Miner. Res.* 16:429-436, 2001.
46. Li, J., Mori, S., Kaji, Y., et al.: Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J. Bone Miner. Res.* 15:2042-2051, 2000.
47. Li, J., Mori, S., Kaji, Y., et al.: Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J. Bone Miner. Res.* 14:969-979, 1999.
48. Lin, J. H.: Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 18:75-85, 1996.
49. Lipton, A., Small, E., Saad, F., et al.: The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: a comparison to pamidronate. *Cancer Invest.* 20 Suppl 2:45-54, 2002.
50. Lyles, K. W., Colon-Emeric, C. S., Magaziner, J. S., et al.: Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N. Engl. J Med.* 357:1799-1809, 2007.
51. Menshutkin, N.: On the action of acetyl chloride on phosphorus acid. *Ann. Chem. Pharm.* 133:317-320, 1865.
52. Michaud, C. M., McKenna, M. T., Begg, S., et al.: The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul. Health Metr.* 4:11, 2006.

53. Monkkonen, J., Simila, J., and Rogers, M. J.: Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci.* 62:L95-102, 1998.
54. Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., et al.: Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 40:91-96, 1987.
55. Nyman, M. T., Paavolainen, P., and Lindholm, T. S.: Clodronate increases the calcium content in fracture callus. An experimental study in rats. *Arch Orthop. Trauma Surg.* 112:228-231, 1993.
56. Otto, T. E., Patka, P., and Haarman, H. J.: Closed fracture healing: a rat model. *Eur. Surg. Res.* 27:277-284, 1995.
57. Pataki, A., Muller, K., Green, J. R., et al.: Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat. Rec.* 249:458-468, 1997.
58. Peter, B., Gauthier, O., Laib, S., et al.: Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 76:133-143, 2006.
59. Peter, B., Pioletti, D. P., Laib, S., et al.: Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone.* 36:52-60, 2005.
60. Peter, C. P., Cook, W. O., Nunamaker, D. M., et al.: Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop. Res.* 14:74-79, 1996.
61. Piirtola, M., Vahlberg, T., Isoaho, R., et al.: Incidence of fractures and changes over time among the aged in a Finnish municipality: a population-based 12-year follow-up. *Aging Clin. Exp. Res.* 19:269-276, 2007.
62. Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., and Bellido, T.: Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem.* 277:8648-8657, 2002.
63. Plotkin, L. I., Manolagas, S. C., and Bellido, T.: Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone.* 39:443-452, 2006.
64. Plotkin, L. I., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., et al.: Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest.* 104:1363-1374, 1999.
65. Praemer, A., Furner, S., and Rice, D.P.: *Musculoskeletal conditions in the United States.* Park Ridge, IL, USA: American Academy of Orthopaedic surgeons, 1992.

66. Reikeras, O., Wang, J. E., Foster, S. J., et al.: Staphylococcus aureus peptidoglycan impairs fracture healing: an experimental study in rats. *J. Orthop. Res.* 25:262-266, 2007.
67. Reilly, J.: Basic Animal Handling and Anaesthesia for Rats, Mice and Rabbits. In: Green, M.K. and Mandel, T.E. (eds.), *Experimental Transplantation Models in small Animals*. Chur, Switzerland, Harvard Academic Publishers GmbH, 1-53, 1995.
68. Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., et al.: Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 60:6001-6007, 2000.
69. Rogers, M. J.: New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr. Pharm. Des.* 9:2643-2658, 2003.
70. Rogers, M. J., Gordon, S., Benford, H. L., et al.: Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 88:2961-2978, 2000.
71. Russell, R. G., Rogers, M. J., Frith, J. C., et al.: The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner. Res.* 14 Suppl 2:53-65, 1999.
72. Sachs L.: *Angewandte Statistik*. 7.Auflage, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1992.
73. Schenk, R.K.: Biology of fracture repair. In: Browner, B.D., Jupiter, J.B., Levine, A.M., Traften, P.G. (eds.) *Skeletal Trauma*. Philadelphia, PA, USA: W.B. Saunders Company, 31-75, 1998
74. Schmidmaier G., Wildemann B., Melis B., et al.: Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma.* 30:35-42, 2004.
75. Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., et al.: Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury.* 37 Suppl 2:S105-S112, 2006.
76. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., et al.: Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone.* 28:341-350, 2001.
77. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Ostapowicz, D., et al.: Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J. Orthop. Res.* 22:514-519, 2004.
78. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, et al.: Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J. Biomed. Mater. Res.* 58:449-455, 2001.

79. Seshima, H., Yoshinari, M., Takemoto, S., et al.: Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 78:215-221, 2006.
80. Shanbhag, A. S.: Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *J Am Acad. Orthop. Surg.* 14:215-225, 2006.
81. Skoglund, B., Holmertz, J., and Aspenberg, P.: Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J. Orthop. Res.* 22:1108-1113, 2004.
82. Tagil, M., Astrand, J., Westman, L., et al.: Alendronate prevents collapse in mechanically loaded osteochondral grafts: a bone chamber study in rats. *Acta Orthop. Scand.* 75:756-761, 2004.
83. Takaoka, K., Koezuka, M., and Nakahara, H.: Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J. Orthop. Res.* 9:902-907, 1991.
84. Tarvainen, R., Olkkonen, H., Nevalainen, T., et al.: Effect of clodronate on fracture healing in denervated rats. *Bone.* 15:701-705, 1994.
85. Tengvall, P., Skoglund, B., Askendal, A., et al.: Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. *Biomaterials.* 25:2133-2138, 2004.
86. Thiebaud, D., Sauty, A., Burckhardt, P., et al.: An in vitro and in vivo study of cytokines in the acute-phase response associated with bisphosphonates. *Calcif. Tissue Int.* 61:386-392, 1997.
87. Trampisch H.J. and Windeler J.: *Medizinische Statistik.* Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 1997.
88. Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., et al.: Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 291:680-686, 2002.
89. Widler, L., Jaeggi, K. A., Glatt, M., et al.: Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). *J Med. Chem.* 45:3721-3738, 2002.
90. Wildemann, B., Kandziora, F., Krummrey, G., et al.: Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J. Control Release.* 95:249-256, 2004.
91. Winckler, S., Brug, E., Meffert, R., et al.: [Resorbable antibiotic delivery systems in local treatment of chronic osteitis--polyglycolic acid/poly-L-lactide as drug carrier. Experimental studies in vitro]. *Langenbecks Arch Chir.* 377:112-117, 1992.
92. Wolfensohn, S. and Lloyd, M.: *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare.* Oxford, England: Oxford University Press, 1994.

93. Wu, P. and Grainger, D. W.: Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials*. 27:2450-2467, 2006.
94. Yoshinari, M., Oda, Y., Inoue, T., et al.: Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials*. 23:2879-2885, 2002.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten auf zellulärer Ebene

Abb. 2: a – inorganisches Pyrophosphat; b – Grundstruktur BP

Abb. 3: Zoledronat (Strukturformel)

Abb 4: Schemaskizze der im Versuchsaufbau verwendeten Frakturmaschine mit Beschriftung

Abb. 5: Abbildung der Torsionsmaschine mit Beschriftung

Abb. 6: Haltevorrichtung (a); Haltevorrichtung mit eingespannter Tibia und angelegter Visierhilfe (b); Haltevorrichtung mit beidseits eingebetteter Tibia (c)

Abb. 7: Testkurve einer Rattentibia. Auf der Y-Achse markiert, der Punkt der maximalen Kraft, die zur Fraktur der Tibia aufgewendet wurde. Die hellrote Gerade wurde tangential angelegt und hierüber die torsionale Steifigkeit ermittelt

Abb. 8: Anteil der erzielten Frakturen (gemäß AO-Klassifikation) an der Gesamtmenge der Versuchstiere mit Beispielbildern der Frakturmuster in Anlehnung an www.aofoundation.org

Abb. 9: Röntgenaufnahmen der rechten Tibiae von Ratten der drei Gruppen (a = ohne Beschichtung, b = PDLLA, c = ZOL) nach Fraktur bei 42 Tagen Standzeit

Abb. 10: Maximales Drehmoment der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 42 Tagen Standzeit

Abb. 11: Maximale torsionale Steifigkeit der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 42 Tagen Standzeit

Abb. 12: Maximales Drehmoment der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 84 Tagen Standzeit

Abb. 13: Maximale torsionale Steifigkeit der frakturierten Rattentibiae im Vergleich zur kontralateralen gesunden Gegenseite nach 84 Tagen Standzeit

Abb. 14: Gegenüberstellung der Ergebnisse des maximalen Drehmoments nach 42 und 84 Tagen Standzeit

Abb. 15: Gegenüberstellung der Ergebnisse der maximalen torsionalen Steifigkeit nach 42 und 84 Tagen Standzeit

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gruppeneinteilung nach Beschichtung und Standzeit

Tab. 2: Temperatur und Körpergewicht der Versuchstiere im zeitlichen Verlauf

Tab. 3: Konsolidierung der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

Tab. 4: Mittlere Kallusfläche der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

Tab. 5: Polares Flächenträgheitsmoment der Frakturen nach Gruppen und Zeitpunkten

9. Abkürzungsverzeichnis

ALE	Alendronat
ATP	Adenosin Triphosphat
BP	Bisphosphonat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
FPPS	Farnesyl Diphosphat Synthetase
GTP	Guanosin Triphosphat
HA	Hydroxylapatit
IBA	Ibandronat
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
i.v.	intravenös
N-BP	Stickstoff-haltige Bisphosphonate
OB	Osteoblast
OK	Osteoklast
OPG	Osteoprotegerin
OZ	Osteozyt
PAM	Pamidronat
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLLA	Poly-(D,L)-Laktid
PPi	Inorganisches Pyrophosphat
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
TGF- β 1	Transforming Growth Factor β 1
WHO	World Health Organization
ZOL	Zoledronat

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich **Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Norbert P. Haas**, Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) der Charité und **Herrn Univ.-Prof. Dr. Dipl.-Ing. Georg Duda**, Leiter des Julius-Wolff-Instituts, für die Möglichkeit in der Forschung des CMSC meine Dissertation durchführen zu können.

Ebenfalls großer Dank und Respekt gebührt meinem Doktorvater,

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Gerhard Schmidmaier und

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Britt Wildemann

für die freundliche Überlassung meines Dissertationsthemas, ständige Ansprechbarkeit und bekräftigende Förderung.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer, **Herrn Dr. med. Stefan Greiner** für die hervorragende und motivierende Begleitung bei Planung, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit. Sein Interesse am Fortschreiten meiner Arbeit war mir eine große Hilfe.

Meiner Mitdotorandin **Mahtala Alidoust** danke ich für den Beistand und die Freundschaft, die sie mir zu jeder Zeit geboten hat.

Der Arbeitsgruppe um **Herrn Dr. med. Philipp Schwabe**, mit den Doktorandinnen **Jana Eberhart** und **Kerstin Dähn** gebührt Dank für die Hilfe bei der Aneignung der technischen Untersuchungs- und Testungskennnisse.

Bei der Auswertung der Biomechanik erhielt ich eine sehr hilfreiche Anleitung und Unterstützung durch **Herrn Dipl.Ing. Jan Hoffmann** und **Herrn Alexander Schill**, sowie den Doktoranden **Herrn Daniel Ostapowicz** und **Herrn Daniel Toben**.

Großen Dank für seine Geduld mit mir und seine unersetzliche Hilfe in statistischen Fragen zolle ich auch **Herrn Dr. med. Peter Schlattmann**.

Tief verbunden fühle ich mich **Frau Dr. phil. Inga Schreurs** für Ihren freundschaftlichen und stets hilfreichen Rat beim Verfassen dieser Arbeit.

Letztlich möchte ich allen Mitarbeitern und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe und des Forschungslabors des CMSC für die Kollegialität und vielfältige Unterstützung danken, die ich durch sie erleben durfte.

11. Publikationen und Vorträge

Teile dieser Doktorarbeit wurden in folgenden Artikeln bzw. Vorträgen publiziert:

Stefan H Greiner, Britt Wildemann, **David A Back**, Mahtala Alidoust, Philipp Schwabe, Norbert P Haas and Gerhard Schmidmaier

Local Application of Zoledronic Acid incorporated in a Poly(D,L-Lactide) coated implant accelerates achievement of biomechanical stability in Fracture Healing in Rats
Acta Orthopaedica - accepted

Greiner S, **Back D**, Alidoust M, Wildemann B, Schmidmaier G

Die lokale Applikation von Zoledronsäure beschleunigt die Frakturheilung der Ratte
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin 2007

Greiner S, Wildemann B, **Back D**, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G
Local Application of Zoledronic Acid incorporated in a Poly(D,L-lactide) coated implant accelerates Fracture Healing in Rats

54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco 2008

Back D, Greiner S, Alidoust M, Schmidmaier G, Wildemann B

Stimulation of fracture healing by local application of a Bisphosphonate

18th European Students' Conference, Berlin 2007

Hierbei Preis als *Session Winner* in der Kategorie *Traumatology/Orthopaedics* und Preis als *Fourth Best Presenter* in der *Final Grand Jury*.

Back DA, Greiner S, Alidoust M, Wildemann B, Schmidmaier G

Beschleunigung der Frakturheilung durch die lokale Applikation von Zoledronsäure aus einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung

38. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie e.V., Ulm 2007

Back D, Greiner S, Alidoust M, Wildemann B, Schmidmaier G

Local application of Zoledronic acid from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats

3rd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig 2007

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

13. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, David Alexander Back, erkläre, dass ich die hier vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema

„Einfluss lokaler Applikation von Bisphosphonaten (Zoledronat) auf die Frakturheilung - Eine biomechanische Studie am Rattenmodell“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift