

Aus dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Frakturheilung unter dem Einfluss
von Simvastatin am Rattenmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Morawski

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Wildemann
 2. Prof. Dr. A. Nüssler
 3. Prof. Dr. R. Meffert

Datum der Promotion: 24. April 2009

Widmung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Die reguläre Frakturheilung	7
1.2	Störungen der Frakturheilung	11
1.3	Wachstumsfaktoren	12
1.3.1	Bone Morphogenetic Protein (BMP)	13
1.3.2	Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)	14
1.4	Stimulation der BMP Synthese	14
1.5	Bisherige Indikationen der Statine	16
1.6	Wirkungsmechanismus und Wirkungen der Statin	18
1.7	Weitere Effekte der Statine	19
1.8	Applikationsformen der Statine	21
1.9	Drug Delivery System	22
1.10	Ziel des Versuchsvorhabens	23
1.11	Hypothese des Versuchsvorhabens	23
2.	Material und Methoden	24
2.1	Versuchstiere	24
2.2	Gruppeneinteilung	24
2.3	Implantate und Beschichtungen	25
2.4	Operatives Vorgehen	26
2.4.1	Verwendete Materialien	26
2.4.2	Durchführung	27
2.5	Röntgenkontrolle	30
2.5.1	Verwendete Materialien	30
2.5.2	Durchführung	31
2.6	Untersuchungen	32
2.6.1	Verwendete Materialien	32
2.6.2	Durchführung	32
2.7	Tötung und Knochenentnahme	32
2.7.1	Verwendete Materialien	32
2.7.2	Durchführung	33
2.8	Biomechanische Testung	34
2.8.1	Verwendete Materialien	34
2.8.2	Torsionsmaschine	34
2.8.3	Einbetten der Tibiae	35
2.8.4	Torsionale Testung	37
2.8.5	Auswertung der Computerdaten	37
2.9	Histomorphologische / Histomorphometrische Auswertung	39
2.9.1	Knochenaufbereitung	39
2.9.1.1	Verwendete Materialien	39
2.9.1.2	Durchführung	39
2.9.2	Herstellung der histologischen Schnitte	40
2.9.2.1	Verwendete Materialien	40
2.9.2.2	Durchführung	41
2.9.3	Färbung der histologischen Schnitte	41

2.9.3.1	Verwendete Materialien	41
2.9.3.2	Durchführung	42
2.9.4	Auswertung der histologischen Schnitte	44
2.9.4.1	Verwendete Materialien	44
2.9.4.2	Durchführung	44
2.10	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Ausfälle	47
3.2	Körpergewicht und Körpertemperatur	47
3.3	Radiologische Untersuchungen	48
3.3.1	Einteilung nach der AO-Klassifikation	48
3.3.2	Radiologische Beurteilung der Kortikalisüberbrückung	49
3.4	Biomechanische Testung	51
3.5	Histomorphologische u. histomorphometrische Auswertung	55
3.5.1	Histomorphologie	55
3.5.2	Histomorphometrie	59
4.	Diskussion	63
4.1	Radiologie	63
4.2	Biomechanik	64
4.3	Histomorphologie und Histomorphometrie	64
4.4	Vergleich mit den Ergebnissen nach 28 Tagen	65
4.5	Vergleich mit anderen Studien	66
4.6	Applikationsmöglichkeiten	69
4.7	Verwendete Dosierungen	70
4.8	Zusammenhang zwischen Statinen und BMP-2	71
4.9	Aussichten	73
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	76
7.	Abkürzungsverzeichnis	82
8.	Abbildungsverzeichnis	83
9.	Tabellenverzeichnis	84
10.	Danksagung	85
11.	Lebenslauf	86
12.	Eidesstattliche Erklärung	87

1. Einleitung

Die Frakturheilung ist ein komplexer physiologischer Prozess, bei dem in 5 bis 10% der Fälle Komplikationen auftreten ¹. Neben den Störungen, die beim Trauma selbst oder bei der operativen Versorgung auftreten können, wie Blutverlust, Infektionen, Verletzungen von Gefäßen, Nerven und Weichteilen, Kompartmentsyndrom und bleibender Funktionsverlust, korreliert ein Großteil der postoperativen Komplikationen mit der Behandlungsdauer.

Vor allem die Bildung einer tiefen Beinvenenthrombose mit der daraus resultierenden Lungenarterienembolie durch längere Immobilisation des Patienten ist als eine wichtige Komplikation zu nennen, die neben der nosokomialen Pneumonie hauptsächlich aus längerer Liegedauer resultiert.

Das Risiko für eine verzögerte (delayed union) bzw. ausbleibende (non-union) Wiedervereinigung der Frakturrenden bei einer mit einem unaufgebohrten Nagel versorgte Tibiaschaftfraktur liegt bei 16,7% ².

Auch die Gefahr des Auftretens einer postoperativen Infektion durch nosokomiale Erreger (mit einer Häufigkeit von 0,5%) bzw. einer Osteomyelitis (1,5%) ² steigt mit der Behandlungsdauer.

Diese Risiken können durch eine verbesserte bzw. beschleunigte Frakturheilung reduziert werden. Daher wird seit vielen Jahren versucht, die Frakturheilung einerseits mit immer neueren und verbesserten Osteosyntheseverfahren zu optimieren, andererseits mittels lokal oder systemisch wirkender Faktoren zu beschleunigen, wobei der Einsatz von Wachstumshormonen und Wachstumsfaktoren eine besondere Rolle spielt. Zu den effektivsten osteoinduktiven Wachstumsfaktoren zählen das Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) und das BMP-7, die bisher in zahlreichen Studien untersucht wurden und mit unterschiedlicher Indikation bereits klinisch verwendet werden.

Durch die daraus resultierende Möglichkeit der Minimierung der Komplikationsrate bzw. der Verkürzung der Behandlungsdauer erhofft man sich neben einer Senkung der Kosten für das Gesundheitswesen (Krankenhausliegezeit, Nachbehandlung etc.) auch ein frühzeitigeres Wiedererlangen der Arbeitsfähigkeit, eine Reduzierung der Erwerbsminderung oder Frühberentung des Patienten und damit einen großen Gewinn an Lebensqualität.

Aus diesen Gründen sind weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Frakturheilung sinnvoll und notwendig, v.a. auf dem Gebiet der biologischen Stimulation der Knochenheilung. Ideal wäre der Einsatz von Substanzen, die schon klinisch zugelassen und weit verbreitet in der Anwendung sind.

Hinweise aus klinischen und auch experimentellen Studien deuten auf einen heilungsstimulierenden Effekt von Statinen hin, die durch die Stimulation des Wachstumsfaktors BMP-2 anabol auf den Knochen wirken könnten.

1.1 Die reguläre Frakturheilung

Die physiologische Frakturheilung ist ein Reparatursprozess, bei dem es sich um die knöcherne Wiedervereinigung zweier voneinander getrennter Knochenteile handelt. Dabei kommt es nicht, wie bei den Weichteilen, zur Ausbildung von Narbengewebe, sondern zur Regeneration von Knochengewebe mit regelrechten anatomischen Strukturen³. Bei diesem Vorgang sind neben verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten auch Hormone, Zytokine, extrazelluläre Matrixproteine und verschiedene Wachstumsfaktoren beteiligt, die vor allem für die Regulation des Frakturheilungsprozesses zuständig sind⁴.

In Abhängigkeit von der Art der Knochenbruchheilung kann sie auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen:

- **primäre (direkte)** Frakturheilung **ohne** Kallusbildung
- **sekundäre (indirekte)** Frakturheilung **mit** Kallusbildung

Primäre (direkte) Frakturheilung:

Bei dieser Form der Frakturheilung kommt es zur Vereinigung der Fraktarenden durch direktes Vordringen Havers'scher Systeme von dem einen Fragment in das andere. Es kommt zur desmalen Ossifikation, bei der die Knochenneubildung unmittelbar aus dem mesenchymalen Gewebe hervorgeht, weswegen dieser Knochen auch als Bindegewebsknochen bezeichnet wird.

Dabei ist eine Heilung nur möglich, wenn beide Enden ohne bzw. nur mit einem sehr kleinen Frakturspalt von weniger als 0,5 mm direkt aneinander liegen und durch eine rigide innere Fixation keiner Überbrückung durch einen stabilisierenden Kallus

bedürfen³. Dies kommt aber unter physiologischen Bedingungen selten vor. Lediglich durch eine Kompressions-Osteosynthese, die auch in mikroskopischen Dimensionen jede Bewegung der Frakturrenden gegeneinander verhindert, kommt es zu dieser Konstellation.

Sekundäre (indirekte) bzw. natürliche Frakturheilung:

Die sekundäre Knochenbruchheilung, die aufgrund ihrer Häufigkeit klinisch größere Relevanz hat, nimmt auch ohne operativen Eingriff bzw. spezifische Bruchbehandlung den nachfolgend dargestellten Ablauf:

Diese Frakturheilung erfolgt durch die Ausbildung eines Frakturkallus, bestehend aus Bindegewebe, Knorpel- und Knochenzellen, der die beiden Knochenenden zunächst überbrückt und so durch eine Art „Leitgerüst“ für eine gewisse Stabilität sorgt. Dieser knorpelige Kallus wird anschließend schrittweise abgebaut und, analog zur embryonalen Knochenbildung, von Knochengewebe ersetzt, das die Frakturrenden wieder knöchern vereint.

Die indirekte Frakturheilung kann histologisch in fünf Phasen unterteilt werden, die teilweise auch parallel verlaufen^{4,5,6}:

- Fraktur, Hämatombildung und Inflammation
- Ausbildung eines Granulationsgewebes
- Chondrogenese
- Enchondrale Ossifikation / Intramembranöse Ossifikation
- Remodelling

Die an den verschiedenen Phasen beteiligten Zellen, Wachstumsfaktoren und Zytokine sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Stadien verschiedener Zellprozesse und die Ausschüttung der daran beteiligten Signalmoleküle während der Frakturheilung

Tag 1	Hämatombildung, Inflammation Mobilisierung von Mesenchymzellen Osteogenetische Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark	Zytokine: IL-1, IL-6, TNF- α freigesetzt durch Entzündungszellen PDGF, TGF- β freigesetzt durch degranulierende Thrombozyten BMP-2-Expression und beschränkt auf Tag 1 GDF-8-Expression
Tag 3	Beginn der MSC-Proliferation Proliferation und Differenzierung von Präosteoblasten und Osteoblasten in Regionen der intramembranösen Ossifikation Beginn der Angiogenese	Rückgang der Zytokine Expression von TGF- β 2, - β 3, GDF-10, BMP-5, -6 Angiopoietin-1
Tag 7	Höhepunkt der Zellproliferation der intramembranösen Ossifikation zwischen Tag 7 und 10 Beginn von Chondrogenese und enchondraler Ossifikation (Ausreifung der Chondrozyten Tag 9-14)	Höhepunkt der TGF- β 2 und - β 3-Expression Expression von GDF-5 und evtl. von GDF-1
Tag 14	Stillstand der Zellproliferation der intramembranösen Ossifikation, demgegenüber fortgesetzte Aktivität der Osteoblasten Mineralisation des „weichen Kallus“, Knorpelresorption und Ausbildung von Geflechtknochen Neo-Angiogenese, Neubildung von Mesenchymzellen Hochaktive Phase der Osteogenese bis zum Tag 21	Rückgang der Expression von TGF- β 2, GDF-5 und evtl. GDF-1 Expression von BMP-3, -4, -7 und -8 VEGF-Expression Zweiter Anstieg von IL-1 und TNF- α , bis zum Remodelling des Knochens
Tag 21	Remodelling des Geflechtknochens und schrittweise Umbau zu Lamellenknochen	Rückgang der Expression von TGF- β 1 und TGF- β 3, GDF-10 und der BMPs (2-8)

In Anlehnung an Dimitriou 2005⁷

Das bei der Fraktur entstandene Hämatom führt zur Infiltration und Proliferation von Zellen, vorwiegend neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Mastzellen, die eine Entzündungsreaktion (Inflammation) hervorrufen. Das Hämatom, in dem sich ein Netz von Fibrin und Kollagenfibrillen gebildet hat, wird durch ein Granulationsgewebe mit Fibroblasten, neugebildetem Kollagen-Typ-I und zahlreichen Kapillaren durchsetzt, das den Raum zwischen den Frakturrenden ausfüllt. Das Granulationsgewebe führt bereits zur ersten Brückenbildung zwischen den beiden Knochenfragmenten und wird schon als sog. „weicher Kallus“ bezeichnet.

Der Vorgang der sekundären Frakturheilung umfasst die Kombination von intramembranöser und enchondraler Ossifikation⁴. Bei der früh einsetzenden **intramembranösen Ossifikation** wird Knochen direkt gebildet, ohne den Zwischenschritt der Knorpelbildung. Dieser Schritt wird durch die im Periost befindlichen undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen ausgelöst, die sich zunächst zu Osteoprogenitorzellen und dann weiter zu Präosteoblasten und Osteoblasten differenzieren. Diese Zellen beginnen von der inneren Schicht des Periost aus direkt Geflechtknochen zu bilden, der auch als sog. „harter Kallus“ bezeichnet wird, der den knöchernen Defekt relativ stabil, ohne den Umweg über die Knorpelbildung, überbrückt⁴.

Die weniger stabilen Regionen des Frakturspalts werden durch die **enchondrale Knochenbildung** überbrückt. Die enchondrale Kallusbildung wird zunächst durch die Infiltration, Proliferation und Differenzierung von undifferenzierten pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (MCS) zu Knorpelgewebe eingeleitet. Die MCS, die sich u.a. im Frakturhämatom finden, differenzieren sich zu Chondroblasten, Fibroblasten und Osteoblasten aus, wobei die proliferierenden Chondroblasten während der Chondrogenese vermehrt hyalinen Knorpel ausbilden und verschiedene Matrix-Proteine sezernieren. Sie ersetzen nach und nach das Granulationsgewebe durch Knorpel.

Dieser Vorgang beginnt zunächst in den angrenzenden Bereichen des Periosts und im umgebenden Weichteilgewebe der beiden Fraktarenden. Dieser neu entstandene Knorpelkallus bildet sich solange aus, bis er die beiden Fraktarenden miteinander vereint; es ist ein sog. „weicher Kallus“ (soft callus) entstanden⁴.

Mit Abschluss der Vereinigung der beiden Fraktarenden durch den Kallus beginnt die Kallushärtung. Dabei kommt es mit zunehmender Mineralisation der zwischen den Kollagenfasern gelegenen Grundsubstanz durch die Einlagerung von Kalzium zur Ausbildung eines härteren Geflechtknochens, der den weichen Kallus nach und nach ersetzt.

Dazu werden die Chondrozyten und die Knorpelmatrix zunächst abgebaut, damit anschließend die Osteoblasten den neuen Knochen aufbauen können (= enchondrale Ossifikation).

Abschließend kommt es zur Ausbildung des definitiven Knochens. Der Geflechtknochen, der auf dem Weg der intramembranösen und der enchondralen Ossifikation entstanden ist, wird durch lamellären Knochen mit Ausbildung des Harvers'schen Systems und entsprechender Gefäßversorgung ersetzt (= Remodelling).

Diese Umbauvorgänge laufen auf der Basis der BMU ab (BMU = basic multicellular units), zyklisch ablaufende Umbauvorgänge, denen der Knochen zeitlebens unterworfen ist und die aus der engen Kopplung von Resorption durch Osteoklasten und Knochenneubildung durch Osteoblasten („resorption/formation coupling“) resultieren⁸.

Diese Phase beinhaltet also den Aufbau der ursprünglichen Knochenstruktur mit Ausbildung eines Markraums, die nach 6 bis 24 Monaten abgeschlossen sein sollte und somit die sekundäre Frakturheilung abschließt.

1.2 Störungen der Frakturheilung

Der komplexe Vorgang der Frakturheilung, der in den meisten Fällen komplikationslos abläuft und in einer kompletten strukturellen und funktionellen Wiederherstellung des betreffenden Knochens nach 3 bis 4 Monaten endet, kann durch eine Reihe von Faktoren gestört werden.

Insgesamt tritt in 5 bis 10% der Frakturen eine gestörte Heilung auf, erkennbar als verzögerte Heilung („delayed union“, keine Heilung nach 4-6 Monaten) oder als Ausbleiben der Frakturheilung („non-union“, keine Heilung nach 6-8 Monaten). Letztere bezeichnet man auch als **Pseudarthrose**^{9,10}.

Dabei unterscheidet man zwischen einer **atropen Pseudarthrose** mit geringem Reparationsgewebe, die v.a. durch biologische Faktoren wie mangelnder Gefäßneubildung und Weichteilschäden bedingt ist und einer **hypertrophen Pseudarthrose** mit überschießendem, nicht durchbauendem Reparationsgewebe als Folge der mechanischen Instabilität.

Weitere Faktoren, die für die Entstehung einer „delayed union“ bzw. „non-union“ verantwortlich sein können, sind Medikamente wie Steroide, Antikoagulantien, Zytostatika und nichtsteroidale Antirheumatika, hohes Alter, Osteoporose, Mangelernährung, Alkohol- und Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Durchblutungsstörung durch Arteriosklerose und eine Neuropathie.

Auch bei polytraumatisierten Patienten ist das Risiko einer gestörten Frakturheilung erhöht, welches wahrscheinlich durch die lang andauernde Immobilisierung mit fehlendem Muskeltonus und fehlender Belastung verursacht wird.

Wie dargestellt, können die Ursachen für den gestörten Heilungsprozess vielfältig sein, häufig treten sie auch in Kombination auf; in vielen Fällen kann ein Grund auch gar nicht gefunden werden.

1.3 Wachstumsfaktoren

Der bereits beschriebene komplizierte Vorgang der Frakturheilung bedarf einer genauen Steuerung, bei der zahlreiche intra- und extrazelluläre Mechanismen stattfinden. Viele lokal und systemisch wirkende Regulationsfaktoren bzw. Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine beeinflussen bei der Frakturheilung zahlreiche Zelltypen, die u.a. für die Regulation der Kallus- und Knochenbildung zuständig sind. Dabei haben die Wachstumsfaktoren eine entscheidende Bedeutung, die bei jeder Fraktur im Bereich des Frakturspalts und der Umgebung freigesetzt werden.

Diese Steuerelemente fördern während des Heilungsprozesses neben der Zellmigration und Angiogenese auch die Zelldifferenzierung verschiedener Zelltypen wie Osteoblasten, Osteozyten und Chondrozyten ¹¹.

An diesem Punkt wird versucht, therapeutisch in den Prozess der physiologischen Frakturheilung einzugreifen bzw. ihn zu unterstützen, indem durch zusätzliche Applikation von diesen Wachstumsfaktoren erhofft wird, den Heilungsprozess verbessern und beschleunigen zu können, mit dem Ziel, die Komplikationsraten der Frakturheilung zu reduzieren.

Der Einsatz und auch die Untersuchung der Wachstumsfaktoren haben daher in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung in der traumatologischen und orthopädischen Forschung gewonnen, und auch in der eigenen Forschungsgruppe sind sie bereits mehrfach untersucht worden ^{12,13,14,15,16,17}.

Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um Proteine, die von verschiedenen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert und sezerniert werden.

Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Wachstumsfaktoren gehören:

- Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)
- Transforming growth factors (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)
- Insulin-like growth factors (IGF-I, IGF-II)
- Fibroblast growth factors (aFGF, bFGF)
- Platelet derived growth factor (PDGF)
- Bone derived growth factor (β 2-Mikroglobulin)

1.3.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die verschiedenen Wachstumsfaktoren sind bisher in einer Vielzahl von Studien auf die Knochenregenerationsfähigkeit untersucht worden und es zeigte sich, dass v.a. die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) einen deutlichen osteoinduktiven und chondroinduktiven Effekt aufweisen konnten, indem sie Osteozyten und Chondrozyten stimulieren¹⁸.

1965 war es M.R. Urist, der die Auswirkung der Implantation einer demineralisierten Knochenmatrix untersuchte und so eine autoinduzierte, ektope Knochenneubildung beobachtete und in diesem Zusammenhang knochenwachstumsfördernde Faktoren mit Proteincharakter beschrieb¹⁹, die dann später als Bone Morphogenetic Proteins bezeichnet wurden²⁰.

Wozney et al. identifizierten 1988 die genetische Sequenz der BMPs mit der es möglich war, die Proteine rekombinant herzustellen¹⁸. Seitdem sind 15 verschiedene BMPs (BMP-1 bis BMP-15) entdeckt worden, die alle der Transforming Growth Factor (TGF)- β -Superfamilie angehören und sich je nach ihrer chemischen Struktur und ihrer Funktion in verschiedene Gruppen aufteilen. Die BMPs haben einen wichtigen Einfluss auf die Größe, Differenzierung und Apoptose verschiedener Zellen, u.a. auf Osteoblasten und Chondroblasten²¹ und so auch das Potential, die Frakturheilung zu beschleunigen.

1.3.2 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)

Für die vorliegende Arbeit ist BMP-2 von entscheidender Bedeutung, das zusammen mit BMP-7 aufgrund des osteoinduktiven Potentials zu dem am häufigsten untersuchten Wachstumsfaktoren in der Knochenheilung gehört und beide als einzige bisher klinisch zugelassen sind. In zahlreichen in vitro und in vivo Studien konnte die verstärkte Knochen- und Knorpelbildung unter der Applikation von BMP-2 gezeigt werden, indem es die Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten fördert^{22,23}.

So nimmt BMP-2 u.a. entscheidenden Einfluss auf Schritte der intramembranösen und enchondralen Ossifikation²⁴ und es scheint die Synthese und Sekretion von anderen spezifischen Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor (IGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) zu stimulieren²⁵.

Auch Ergebnisse der eigenen Forschungsgruppe weisen den positiven Effekt von BMP-2 auf die Knochenheilung bei lokaler Applikation tierexperimentell nach¹².

Aufgrund der bereits genannten Eigenschaften von BMP-2 und der Ergebnisse einer bereits durchgeführten großen klinischen Studie (BESST-Studie von Govender et al.²⁶) ist davon auszugehen, dass der Einsatz bzw. die Stimulation von BMP-2 für die beschleunigte und verbesserte Frakturheilung auch klinisch eine immer größere Rolle spielen wird.

1.4 Stimulation der BMP-2-Synthese

Vor dem Hintergrund, ein Medikament gegen Osteoporose zu finden, suchten Mundy et al. nach einer Substanz, die die Synthese des osteoinduktiven Wachstumsfaktor BMP-2 stimulieren konnte.

Die bisherigen Osteoporosemedikamente konnten lediglich den Knochenverlust aufhalten, indem sie hemmend auf die Osteoklasten, die knochenabbauenden Zellen, wirken (wie z.B. die Bisphosphonate, Calcitonin, Östrogene oder Östrogen-Rezeptor-Modulatoren und Vitamin-D-Analoga). Mundy suchte aber nach einer Substanz, die knochenanabole Eigenschaften aufweist.

Die damals bereits bekannten knochenanabolen Substanzen (Fluoride, Parathormon) zeigten starke unerwünschte bis toxische Nebenwirkungen^{27,28,29,30,31}.

Daher suchte er nach einer Substanz, die aktivierend auf den BMP-2-Promotor wirkt, um die BMP-2-Expression im Knochen stimulieren zu können.

Unter 30 000 Substanzen wurde Lovastatin als einziges natürliches Produkt identifiziert, das spezifisch den Promotor des BMP-2-Gens triggerte³². Es gehört zur Gruppe der Statine, von denen bis dahin nur bekannt war, dass sie den Cholesterinspiegel im Blut senken.

Anschließend wurden auf die gleiche Weise Simvastatin, Mevastatin und Fluvastatin getestet und alle zeigten einen dosisabhängigen Effekt auf den BMP-2-Promotor.

Um zu beweisen, dass dieser positive Effekt der Statine auf die Blockierung des Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, das Enzym, welches durch die Statine gehemmt wird, zurückzuführen ist, wurde Mevalonat auf die gleiche Weise getestet. Mevalonat ist das Zwischenprodukt in der Cholesterinbiosynthese, dessen Entstehung von dem HMG-CoA-Reduktase-Enzym abhängig ist. Es zeigte sich, dass der positive Effekt, der sich bei den Statinen zeigte, bei Mevalonat nicht auftrat, was darauf hindeutete, dass durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase der Effekt auf den BMP-2-Promotor zu erklären ist.

In weiteren In-vitro-Versuchen konnte Mundy den anabolen Effekt der Statine durch die BMP-2-Stimulation nachweisen³².

In einem In-vivo-Versuch applizierte er subkutane Lovastatin und Simvastatin über der Schädelkalotte von Mäusen, um den direkten Effekt der Statine auf den Knochen nachzuweisen. Unter dieser lokalen Applikation wies er nach bereits 5 Tagen eine um 50% gesteigerte Knochenneubildung nach³².

Aufgrund der Ergebnisse von Mundy folgten bis heute zahlreiche Untersuchungen, die die Statinwirkungen im Zusammenhang mit Frakturheilung, Frakturrisiko und Knochendichte untersuchten. Dabei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse, weswegen die Statinwirkung auf die Knochenregenerationsfähigkeit ein viel diskutiertes Thema darstellt.

Im Gegensatz zu Wachstumsfaktoren ist ein großer Vorteil der Statine, dass sie bereits seit vielen Jahren mit anderen Indikationen klinisch erprobt sind.

1.5 Bisherige Indikationen der Statine

Statine wurden bisher fast ausschließlich zur Senkung des Cholesterinspiegels verwendet und sind in der primären und sekundären Prävention von Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen akzeptiert und spielen klinisch in diesem Zusammenhang eine große Rolle.

Ein hoher Cholesterinspiegel im Blut, v.a. der des LDL (low density lipoprotein)-Cholesterins, korreliert mit dem Risiko des Auftretens einer koronaren Herzerkrankung (KHK), welches die Haupttodesursache in den Industrieländern darstellt.

Ursächlich für die KHK ist in den meisten Fällen die Arteriosklerose, die auch meist Grund von zerebrovaskulären Ereignissen und der generalisierten Gefäßsklerose ist. Obwohl für das Auftreten der Arteriosklerose das Zusammenspiel vieler Faktoren und Prozesse eine Rolle spielen, gibt es eindeutig nachgewiesene Zusammenhänge zwischen einem erhöhten Cholesterinspiegel im Blut und der Arterioskleroseentwicklung in Gefäßen.

Eine der ersten großen Studien, die diesen Zusammenhang darstellte, war die Framingham Study von 1971, in der gezeigt wurde, dass die Senkung des Cholesterinspiegels eine geringere Inzidenz der KHK zur Folge hat³³.

Ein entscheidender Schritt in der Cholesterinbekämpfung war 1973 die Entdeckung der Statine (zunächst Mevastatin), die in der Lage sind, das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), zu hemmen³⁴.

Die klinische Einführung erfolgte 1976³⁵ und seitdem sind die Statine durch dessen erfolgreiche Wirkungen in der Senkung des LDL-Cholesterinspiegels ein oft genutztes Medikament in der Behandlung der Hypercholesterinämie.

Eine weitere Indikation der Statine stellt die koronare Herzkrankheit dar, für die der positive Effekt der Statine bewiesen wurde³⁶.

Den entscheidenden Durchbruch lieferte die 4S-Studie (Scandinavian Simvastatin Survival Study 1994), die unter der Einnahme von Simvastatin eine Abnahme von koronaren Todesfällen um 42% zeigen konnte³⁷.

Andere große Studien in diesem Zusammenhang folgten, die einen positiven Effekt unter der Einnahme von Statinen in der Prävention der KHK zeigen konnten:

- CARE-Studie³⁸
- LIPID-Studie³⁹
- Heart Protective Study⁴⁰
- WOSCOPS⁴¹

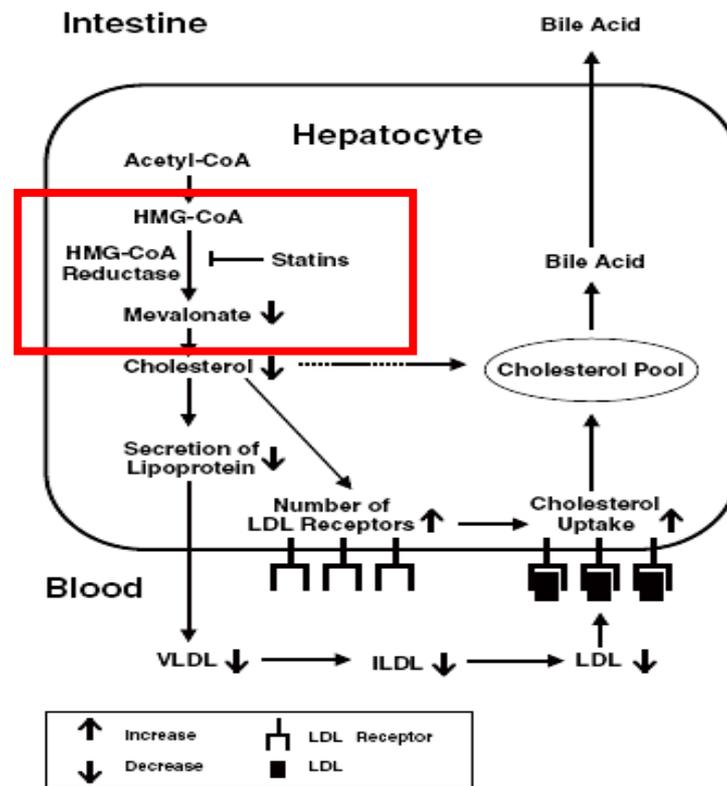
Inzwischen gehören die Statine zu den am häufigsten verordneten Medikamenten in den USA und in Deutschland. 2002 war Atorvastatin (Lipitor®) das weltweit am häufigsten verschriebene Arzneimittel⁴².

In Deutschland stehen die Lipidsenker an Stelle 16 der am häufigsten verordneten Arzneimittelgruppen vom Jahr 2006, wobei die Statine den größten Anteil stellen. Simvastatin (Simvahexal®) steht an 14. Stelle der führenden Arzneimittel nach Verordnungen in Deutschland und erreicht inzwischen schon 82% der Statinverordnungen und hat allein im Jahr 2006 um 18% zugenommen⁴³.

Die cholesterinsenkende Therapie ist mittlerweile zentraler Bestandteil Evidenz-basierter Leitlinien zur Prävention der koronaren Herzkrankheit (National Cholesterol Education Program 2002).

1.6 Wirkungsmechanismus und Wirkungen der Statine

Die Statine hemmen in der Leber das Schrittmacherenzym und somit den entscheidenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese, indem sie reversibel die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) hemmen, den Schritt von HMG-CoA zu Mevalonat (siehe Abb.1). Somit blockieren sie die Bildung der Cholesterinsynthese und senken die intrazelluläre Cholesterinkonzentration ⁴⁴.



(modifiziert nach Horiuchi 2006 ⁴⁵)

Abb. 1: Effekte der Statine auf den Cholesterinmetabolismus. Statine hemmen das Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Reduktase) und verringern so die Mevalonatkonzentration. Zusätzlich wird die Anzahl der LDL-Rezeptoren erhöht und die Sekretion der Lipoproteine vermindert. In den Hepatozyten wird die Aufnahme des LDL-Cholesterins erhöht, mit der Konsequenz eines geringeren Cholesterinspiegels im Blut.

Neben der verminderten Cholesterinsynthese bewirken die Statine zusätzlich eine vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren, die für die Aufnahme des LDL-Cholesterins aus dem Blut hauptverantwortlich sind. In klinischen Studien konnte durch die Statingabe eine Senkung des Gesamtcholesterins um 20%, der des LDL-Cholesterins sogar um 28% nachgewiesen werden ⁴⁶.

Durch die große klinische Relevanz dieser Wirkstoffgruppe sind die unerwünschten Wirkungen bereits gut dokumentiert: Neben den uncharakteristischen Nebenwirkungen wie gastroenteralen Störungen (Diarrhö, Übelkeit, Magen-Darm-Krämpfe) und

Hautausschlägen sind Schädigungen der Leberfunktion (Transaminasenanstieg) und der Skelettmuskulatur mit häufigen Myalgien bis zur Rhabdomyolyse (CK-Anstieg) zu beachten.

1.7 Weitere Effekte der Statine

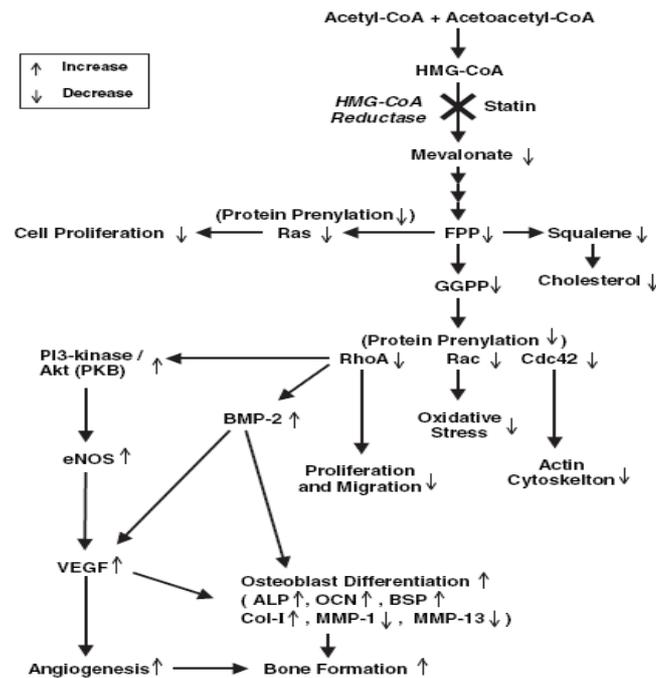
Neben der bereits beschriebenen positiven Wirkung der Statine auf den Cholesterinspiegel im Blut, haben sie weitere Effekte, die als „**Pleiotrope Effekte**“ zusammengefasst werden und die nicht über den cholesterinsenkenden Effekt zu erklären sind.

Zu diesen extrahepatischen Wirkungen gehört auch die schon erwähnte **Stimulation des Knochenwachstums**, weswegen die Statine in der vorliegenden Arbeit die zentrale Rolle spielen.

Diese Effekte sind nicht auf die Leber begrenzt, sondern wirken v.a. systemisch (extrahepatisch), der genaue Wirkungsmechanismus ist aber nicht immer vollständig geklärt.

Bei vielen der pleiotropen Effekte wurde gezeigt, dass sie über die Hemmung von Isoprenoid–Zwischenprodukten des Mevalonatweges wirken, so wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), wobei dieser Weg unabhängig von dem intrazellulären Weg der Cholesterinbiosynthese ist (siehe Abb.2).

Diese Isoprenoide sind wichtige Bestandteile für die posttranslationale Modifikation von verschiedenen Proteinen, die bei intrazellulären Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle spielen, wie small GTP-bindende Proteine (Ras, Rho und Rac), welche u.a. in der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung mitwirken.



(aus Horiuchi 2006⁴⁵)

Abb. 2: Weitere Effekte der Statine über eine Hemmung der Bildung von Isoprenoid-Zwischenprodukten wie FPP und GGPP.

Dabei ist zu erwähnen, dass ausschließlich die lipophilen Statine wie Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin und auch Simvastatin, die passiv durch Zellmembranen diffundieren können, zu diesen pleiotropen Effekten in der Lage sind.

Das ist gerade für die Fragestellung dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung, da hydrophile Statine wie Pravastatin keine extrahepatischen Wirkungen wie die Knochenstimulation zeigten⁴⁷.

Zu den pleiotropen Effekten gehören neben der Stimulation des Knochenwachstums:

- Antiinflammatorische Wirkungen (Senkung des C-reaktiven Proteins)⁴⁸
- Verringerte Thrombozytenaggregation und Thrombusapposition⁴⁹
- Gesteigerte Angiogenese⁵⁰
- Rückgang der koronaren Herzerkrankung und Arteriosklerose⁵¹
- Abnahme der β -Amyloid-Peptid-Akkumulation – im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung⁵²
- Abnahme der T-Lymphozytenaktivität – Immunsuppressive Eigenschaften⁵³

1.8 Applikationsformen der Statine

Zur Therapie der Hypercholesterinämie wurden die Statine bisher immer systemisch (oral) verabreicht, durch die neueren Kenntnisse über die pleiotropen Effekte gibt es nun weitere Möglichkeiten zur Applikation, je nach gewünschter Wirkung.

Bei der Form der Applikation der Statine und auch anderer Stoffe wie z.B. Wachstumsfaktoren sind grundsätzlich die **systemische** (orale und transdermale) und die **lokale** Applikationsform zu unterscheiden.

Die **systemische Applikation** der Statine im Zusammenhang mit dem Knochenmetabolismus wurde mehrfach untersucht, wobei man zu unterschiedlichen Ergebnissen kam.

Mundy zeigte in seiner bereits erwähnten Studie positive Effekte der Statine auf den Knochen unter der oralen Applikation³², Maritz (2001) hingegen konnte in einem sehr ähnlichen Versuch kein einheitlich positives Ergebnis unter der oralen Applikation von Statinen zeigen, es zeigte sich sogar eine Verschlechterung unter Simvastatin in niedriger Dosierung⁵⁴.

Skoglund (2002) war der erste, der die Knocheneffekte unter oraler Statingabe während der **Frakturheilung** untersuchte und biomechanisch und histologisch unter einer sehr hohen Simvastatindosis einen beschleunigten Knochenheilungsprozess im Tiermodell zeigen konnte⁵⁵. Eine andere In-vivo-Studie demonstrierte, dass eine transdermale Verabreichung von Statinen, mit der der First-pass-Effekt der Leber, dem alle Statine unterliegen, umgangen werden konnte, positive Effekte auf den Knochenmetabolismus zu zeigen waren⁵⁶.

Die **lokale Applikation** von Wirksubstanzen zu therapeutischen Zwecken bei Frakturen direkt am Wirkort stellte lange Zeit ein Problem dar, weil neben der unkontrollierten Freisetzung vor allem systemische und lokale Nebenwirkungen anderer Carriersysteme auftraten, wie z.B. Infektionen und sekundäre Dislokationen.

Die lokale Applikation zur Stimulation der Knochenheilung untersuchte Wong (2003), der Knochendefekte im Schädelknochen von Kaninchen mit Simvastatin ausfüllte und als Carrier Kollagenschwämme benutzte, in die die Statine eingearbeitet wurden. Er konnte so den osteoinduktiven Effekt der Statine zeigen, denn unter der lokalen Statinapplikation bildete sich schneller und mehr (308%) neuer Knochen als unter alleiniger Applikation der Kollagenmatrix⁵⁷.

In weiteren Studien zur lokalen Stimulation der Frakturheilung wurden als Carrier u.a. Nanobeats und Minipumpen erfolgreich eingesetzt^{58,59}.

1.9 Drug Delivery System

In der eigenen Forschungsgruppe wurde nach der Möglichkeit gesucht, eine Beschichtung von Osteosynthesematerialien zu finden, die direkt an der Fraktur die Wirksubstanz in ihrer biologisch aktiven Form freisetzt, ohne starke Nebenwirkungen zu haben.

Es zeigte sich, dass mit dem Trägermaterial **Poly(D,L-Laktid) (PDLLA)** genau diese Anforderungen zu erfüllen sind⁶⁰.

Mit Hilfe dieser entwickelten biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung ist es möglich, die darin eingearbeiteten Stoffe wie Wachstumsfaktoren, Antibiotika und auch Simvastatin lokal an der Fraktur von der Implantatoberfläche kontinuierlich freizusetzen, ohne Nebenwirkungen hervorzurufen und trotzdem die nötige mechanische Stabilität zur Frakturversorgung zu gewinnen.

Ein weiterer großer Vorteil dieses „bioaktiven Implantates“ ist, dass die Frakturen nicht eröffnet werden müssen, um die Wirksubstanzen im Frakturbereich zu platzieren und kontrolliert freizusetzen. Darüber hinaus kann das Polylaktid PDLLA hydrolytisch abgebaut und vollständig metabolisiert werden. In diese Trägersubstanz können Wirksubstanzen in einem kalten Beschichtungsverfahren eingearbeitet und sowohl durch den hydrolytischen Abbau des PDLLA als auch durch direkte Diffusion während des Heilungsprozesses freigesetzt werden.

Für das vorliegende Versuchsvorhaben wurden Implantate mit PDLLA genutzt, in die Simvastatin in zwei unterschiedlichen Dosierungen bzw. BMP-2, welches in der Positivkontrollgruppe verwendet wurde, eingearbeitet wurden.

1.10 Ziel des Versuchsvorhabens

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt der lokalen Applikation von Simvastatin in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Frakturheilung in einem Rattenmodell zu untersuchen.

Der Heilungsverlauf wurde durch biomechanische und histomorphometrische Untersuchungen zu zwei Zeitpunkten (28 und 42 Tage) beurteilt, wobei hier hauptsächlich auf die Ergebnisse nach 42 Tagen eingegangen wird.

Die mit Simvastatin stimulierte Frakturheilung wurde dabei mit der unstimulierten Heilung und der durch den osteoinduktiven Wachstumsfaktor BMP-2 beschleunigten Heilung verglichen.

1.11 Hypothese des Versuchsvorhabens

Die lokale Applikation von Simvastatin und dessen kontinuierliche Freisetzung durch ein PDLLA-beschichtetes Implantat stimuliert und beschleunigt dosisabhängig die Frakturheilung.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden für die Untersuchungen fünf bis sieben Monate alte weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 230 bis 270 g der Firma Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) verwendet.

Jeweils 5 Tiere wurden in Typ IV-Käfigen unter artgerechten Umgebungstemperaturen von ca. 22 °C und einem künstlichen zwei mal zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, in denen sie freien Zugang zu Wasser und Futter (V-Alleinfutter für Ratten/Mäuse-Haltung, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) hatten. Vor dem operativen Eingriff befanden sich die Ratten mindestens drei Tage in ihren Käfigen in der tierexperimentellen Einrichtung im Forschungshaus der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, um sich an die Umgebung zu gewöhnen und sich vom Transport zu erholen.

Die Versuchsdurchführung wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit Berlin unter der Nummer G 0147/06 genehmigt.

2.2 Gruppeneinteilung

Für das vorliegende Projekt wurden 200 Versuchstiere verwendet, die nach dem Zufallsprinzip auf fünf Gruppen à 40 Tiere aufgeteilt wurden. Die Gruppen unterschieden sich jeweils in der Beschichtung der verwendeten Implantate, mit denen die standardisierte Fraktur der rechten Tibia stabilisiert wurde.

Die Ratten der ersten Gruppe, welche der Kontrollgruppe Ia entspricht, erhielten unbeschichtete Titan-Kirschner-Drähte, die Tiere der Gruppe II, Kontrollgruppe Ib, wurden mit Poly(D,L-Laktid)-beschichteten Implantaten versorgt, welches bei den eigentlichen Untersuchungsgruppen als Trägermaterial für das Simvastatin diente (siehe Kapitel 1.9).

Die Implantate der Gruppe III und IV, die eigentlichen Untersuchungsgruppen, erhielten ihre Beschichtung mit zwei unterschiedlichen Dosen von Simvastatin (3 µg bzw. 50 µg). Die Gruppe V diente als Positivkontrolle, dessen Titan-Kirschner-Drähte eine Beschichtung mit BMP-2 (50 µg BMP-2/Implantat) erhielten.

Die 40 Tiere jeder Gruppe wurden anschließend nochmals für die spätere Auswertung (Biomechanik bzw. Histophormologie/Histomorphometrie) und für die zwei unterschiedlichen Standzeiten aufgeteilt (28 bzw. 42 Tage), so dass jeweils 10 Tiere derselben Standzeit und Untersuchungsmethode zugeführt wurden (siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2: Gruppeneinteilung des Versuchsvorhabens

<u>Gruppe</u>	<u>Beschichtung</u>	<u>Röntgen</u> Zeitpunkte in Tagen	<u>Biomechanik</u>	<u>Histologie</u>	<u>Anzahl</u>
I	Unbeschichtet (Kontrollgruppe Ia)	0,7,14,28,42	28. Tag 42. Tag	28. Tag 42. Tag	40 Tiere
II	PDLLA (Kontrollgruppe Ib)	0,7,14,28,42	28. Tag 42. Tag	28. Tag 42. Tag	40 Tiere
III	PDLLA + Simvastatin 3 µg/Implantat	0,7,14,28,42	28. Tag 42. Tag	28. Tag 42. Tag	40 Tiere
IV	PDLLA + Simvastatin 50 µg/Implantat	0,7,14,28,42	28. Tag 42. Tag	28. Tag 42. Tag	40 Tiere
V	PDLLA + BMP-2 (Positivkontrolle)	0,7,14,28,42	28. Tag 42. Tag	28. Tag 42. Tag	40 Tiere

Tag 0 = post OP

2.3 Implantate und Beschichtungen

Implantate:

- Intramedullärer Krafträger: Beschichtete titanlegierte (Ti-6Al-4V) Kirschnerdrähte (Durchmesser: 1,0 mm) (Firma Synthes® [Clinical House GmbH, Bochum, Deutschland])

Beschichtung:

- Trägermaterial: Poly(D,L-Laktid), Resomer 203 (PDLLA) (Boeinger, Ingelheim)
- Wirkstoff: Simvastatin low dose*: 3 µg pro Implantat
Simvastatin high dose*: 50 µg pro Implantat
rhBMP-2 (Osteogenetics, Würzburg): 50 µg pro Implantat

*Die simvastatinbeschichteten Nägel wurden von Dr. Milvia Lepre, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Die Implantate dienen zum einen der intramedullären Stabilisation der Fraktur und zum anderen, bei Gruppe II bis V, zusätzlich der lokalen Applikation der jeweiligen Beschichtung.

2.4 Operatives Vorgehen

2.4.1 Verwendete Materialien

Implantate:

Je nach Versuchsgruppe beschichtete bzw. unbeschichtete Titan-Kirschnerdrähte (siehe 2.2).

Narkose:

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

Operation:

Operationsbesteck (steril):

- Nadelhalter
- Präparationsschere
- Pinzette (anatomisch und chirurgisch)
- Einmal-Skalpel No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Medical Division, Osaka, Japan)
- Kirschnerdraht aus Stahl (Durchmesser 1 mm)
- 0,8 mm Kirschnerdraht aus Stahl
- Kneifzange
- Hautfäden: Prolene® 4-0, nichtresorbierbar (Ethicon GmbH & Co.KG; Norderstedt, Deutschland)

Frakturmaschine: siehe Abb. 6

Sterilgut:

- Einmalhandschuhe; Gammex® PF (Ansell (UK) Ltd, Tamworth, Staffordshire, UK)
- Abdecktuch 75 x 90 cm; Foliodrape® (Hartmann Ag, Heidenheim, Deutschland)
- Desinfektionsspray; Softasept N® [100% Ethanol] (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Mulltupfer Röko-steril 20 x 20 cm (Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen, Deutschland)
- Präpariertupfer RK (Lohmann und Rauscher, Deutschland)

Geräte:

- Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Digital Thermometer (Paul Hartmann LTD, Heywood, U.K.)
- Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Röntgen-Bogen Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Deutschland)

Sonstiges:

- Einmalhandschuhe (Johnson&Johnson Intl., New Brunswick, USA)
- Verbandsmaterial Leukoplast® (Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Panthenol-Augensalbe Jenapharm®
- Gleitmittel Lidocainhydrochlorid, Xylocain® Gel 2% (Astra GmbH, Wedel, Deutschland)
- Enthaarungscreme Plica® [Thioglycolsäure] (Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Filzstift (Edding® Nr. 3000) in drei verschiedenen Farben (blau, rot, grün) (Edding AG, Ahrensburg, Deutschland)
- Sprühpflaster Band-Aid™ (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Mundschutz, OP-Gesichtsmaske (Farstar®, Hamburg, Deutschland)

2.4.2 Durchführung

Vor der Operation wurden die Versuchstiere zunächst narkotisiert und analgesiert. Dazu wurden die Ratten in eine spezielle Narkosebox gesetzt, in die vom Narkosegerät ein Gasgemisch aus Sauerstoff (0,8 l/min), Lachgas/ N₂O (1,2 l/min) und Isofluran (5 Vol.%) geleitet wurde.

Anschließend erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Ketanest (60 mg/kg KG) und Xylazin (4 mg/kg KG) mit einer Dosierung von 2 ml/kg Körpergewicht (nach der Empfehlung des Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare von S. Wolfensohn, University of Oxford).

Nach der Kennzeichnung der Tiere durch eine Markierung des Schwanzes mithilfe mehrfarbiger Filzstifte folgte die Gewichts- und rektale Temperaturmessung.

Um das Infektionsrisiko so gering wie möglich zu halten, wurde das rechte Bein mit einem elektrischen Haarscherer rasiert, verbliebene Haare mit einer Enthaarungscreme entfernt und das Operationsgebiet mittels Sprühdesinfektion großflächig desinfiziert.

Nach Sicherstellung der tiefen Bewusstlosigkeit und ausreichender Analgesie konnte die Operation unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Zu Beginn wurde ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt auf Höhe des rechten Tibiakopfes durchgeführt (siehe Abb. 3). Dabei orientierte man sich anhand des Venengeflechtes des Rattenbeins, welches gut durch die rasierte Haut zu sehen war.



Abb. 3: Hautschnitt auf Höhe des rechten Tibiakopfes

Anschließend wurde mit Hilfe eines Kirschnerdrahtes aus Stahl mit einem Durchmesser von 1 mm die Kortikalis medial des rechten Tibiakopfes bis zum Markraum durchbohrt. Der Draht wurde dann innerhalb des Markraumes distal soweit vorgeschoben, bis ein deutlicher Widerstand zu spüren war. Ein Kirschnerdraht mit einem Durchmesser von 0,8 mm wurde erneut in den bereits vorgebohrten Markraum bis in die distale Tibia geschoben, um für den eigentlichen Nagel, der nach der Frakturierung die Tibia stabilisieren soll (Durchmesser 1,0 mm), eine bessere Verankerung zu ermöglichen (siehe Abb. 4).

Dieses Vorbohren des Markraums wurde durchgeführt, um nach der Frakturierung das „Auffädeln“ der Frakturrenden zu ermöglichen bzw. zu erleichtern.

Das Vorbohren und später auch die Stabilisierung der Fraktur wurden unter ständigen Kontrollen eines Bildwandlers durchgeführt (siehe Abb. 5).

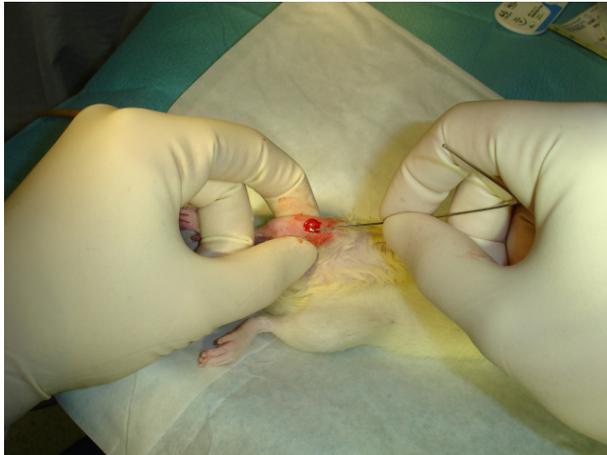


Abb. 4: Vorbohren des Markraums

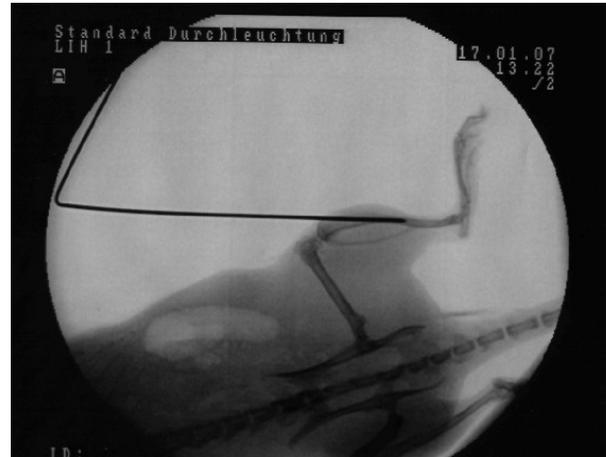


Abb. 5: Kontrollaufnahme mit Bildwandler

Mit einer speziell für diese Versuche entwickelten Frakturmaschine (siehe Abb. 6), welche nach dem Prinzip der Dreipunktebiegung funktioniert⁶¹ wurde den Versuchstieren anschließend eine standardisierte Fraktur der rechten Tibia und der Fibula zugefügt, mit dem Ziel einer geschlossenen Querfraktur der Tibiadiaphyse (AO 42-A1/A2/A3).

Hierbei wurde das nach außen rotierte rechte Bein auf zwei Metallschienen (Nr. 4 in der Abb.) gelegt (Abstand 20 mm) und der Hinterlauf so gegen eine variabel verschiebbare Fixationsplatte (Nr. 5) angelegt, dass das Bein eine stabile Position erreichte, die zunächst mit einem Metallstempel (Nr. 3) fixiert wurde.

Nach optimaler Positionierung wurde auf die rechte Tibia ein 600 g schweres Gewicht (Nr. 1) entlang einer Führungsstange (Nr. 2) aus einer Höhe von 15 cm durch manuelle Entfernung eines Haltestiftes losgelassen, so dass es im freien Fall auf die Tibia fiel, mit dem Ergebnis der kontrollierten gewünschten Fraktur von Tibia und Fibula.

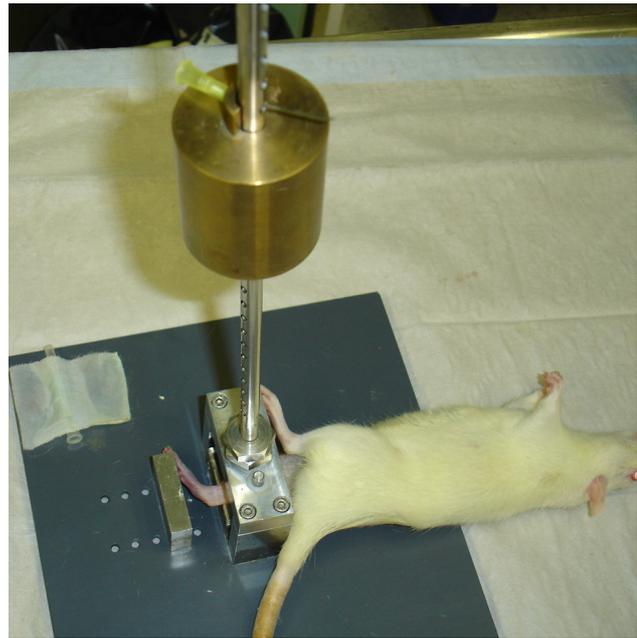
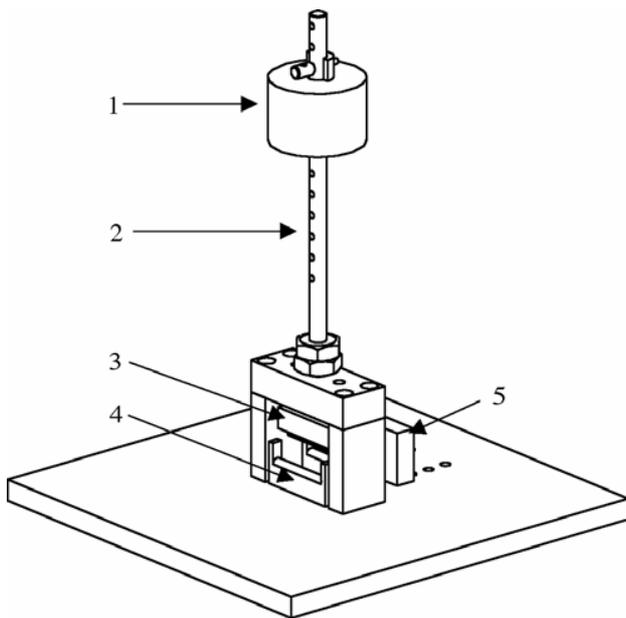


Abb. 6: Frakturmaschine zur Erzeugung einer standardisierten Fraktur

Nach Kontrolle der Fraktur bzw. der richtigen Frakturhöhe mit dem Bildwandler wurde der Bruch zunächst reponiert und je nach Gruppezugehörigkeit (siehe Tab. 1) mit einem beschichteten bzw. unbeschichteten Titan-Kirschner-Draht (Durchmesser 1,0 mm) stabilisiert.

Anschließend wurde der nach außen überstehende Draht abgeknipst und die Hautinzision mit zwei bis drei Einzelknopfnähten verschlossen. Zusätzlich wurde die Wunde mit einem Sprühpflaster versorgt und das Bein mit einem Tapeverband stabilisiert.

2.5 Röntgenkontrolle

2.5.1 Verwendete Materialien

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

2.5.2 Durchführung

Zur Kontrolle und Dokumentation des Operationsergebnisses wurde eine Röntgenuntersuchung in zwei Ebenen (posterior-anterior [p.a.] und lateral) durchgeführt (siehe Abb. 7 und 8).

Für die laterale Aufnahme wurde das Versuchstier auf den Bauch gelegt und das rechte operierte Bein in abduzierter und außenrotierter Position mit einem Pflaster fixiert und mit entsprechender Nummerierung (Röntgenzahlen) gekennzeichnet. Für die p.a.-Aufnahme entsprechend um 90° gedreht, so dass die Tibiavorderkante senkrecht zur Röntgenplatte stand.

Die Röntgenaufnahmen erfolgten mit einer Strahlenhärte von 52 kV und einer Belichtungszeit von 1,8 mAs, bei einem Abstand zwischen Gerät und Platte von 60 cm.

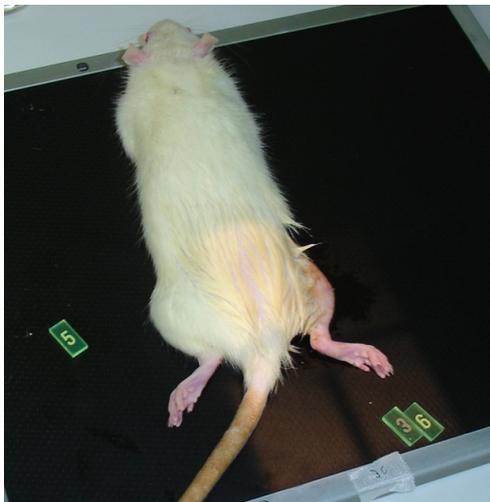


Abb. 7: Anfertigung eines postop. Röntgenbildes



Abb. 8: Röntgenbild mit stabilisierter Fraktur

Um postoperativ das Auskühlen der Tiere zu vermeiden, wurden sie unter eine wärmende Rotlichtlampe gelegt, bis sie nach ca. 120 bis 180 min erwachten.

2.6 Untersuchungen

2.6.1 Verwendete Materialien: Siehe Kap. 2.4.1 und 2.5.1

2.6.2. Durchführung

Um mögliche aufgetretene postoperative Komplikationen auszuschließen wurden die Versuchstiere täglich untersucht.

Zur Kontrolle des Heilungsverlaufs und zur Beurteilung der Kallusentwicklung im Frakturbereich wurden am 7., 14., 28. und eventuell am 42. Tag (je nach Standzeit) erneut Röntgenbilder in zwei Ebenen angefertigt. Mit diesen Aufnahmen wurden auch eventuelle Implantatlockerungen, Nagelwanderungen oder postoperative Heilungskomplikationen kontrolliert und dokumentiert.

Des Weiteren wurden an jedem Untersuchungstag erneut das Gewicht und die Temperatur gemessen und dokumentiert.

Für die beschriebenen Untersuchungen erhielten die Ratten eine Inhalationsnarkose, bestehend aus dem Sauerstoff-Lachgas-Isfluran-Gemisch in den gleichen Konzentrationen, wie bereits oben beschrieben.

2.7 Tötung und Knochentnahme

2.7.1 Verwendete Materialien

Narkose: Siehe Kapitel 2.4.1

Tötung und Knochenentnahme:

- Einmal-Skalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division)
- Einmalhandschuhe (Johnson&Johnson Intl., New Brunswick, USA)
- Einmalspritze 5 ml (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kanülen, steril, 24 G (BD Microlance™ 3, Drogheda, Irland)
- Kaliumchlorid 14,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Präparierschere (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Kleine Pinzette (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Seitenschneider/Lüer
- Isotonische Kochsalzlösung Plastipur® (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)
- Mullkompressen 10 x 10 cm 8fach, BEESANA® (Karl Beese GmbH & Co. KG, Bursbüttel Deutschland)

2.7.2 Durchführung

Die Tötung der Tiere erfolgte entweder am 28. Tag oder am 42. Tag, um sie anschließend der biomechanischen Testung oder der histologischen Aufarbeitung zuzuführen.

Die Tötung und Auswertung nach 28 Tagen wurde von Franziska Luttsch durchgeführt, deren Dissertation sich ausschließlich mit den Ergebnissen nach 28 Tagen beschäftigt.

In der vorliegenden Arbeit werden lediglich die Ergebnisse nach 42 Tagen dargestellt.

Die Ratte wurde zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran sediert (siehe Kapitel 2.4.2) und anschließend durch eine intraperitoneale Überdosierung des Gemisches aus Ketanest und Xylazin zusätzlich ausreichend betäubt.

Nach sicherer Feststellung der ausreichenden Analgosedierung erfolgte die intrakardiale Applikation von ca. 2 ml Kaliumchlorid (14,9%), so dass das Versuchstier innerhalb von Sekunden ohne Leiden verstarb.

Vor der Präparatentnahme wurden noch einmal abschließende Röntgenbilder (p.a. und lateral) durchgeführt (siehe Kapitel 2.5), die der späteren radiologischen Auswertung dienten.

Anschließend wurde die rechte frakturierte Tibia entnommen und, wenn sie der biomechanischen Testung zugeführt wurden, auch die gesunde linke Tibia, die als Referenzwert bei der biomechanischen Untersuchung diene.

Nach Freipräparation der Tibia und Exartikulation aus dem Knie- und Sprunggelenk wurde zunächst die Fibula entfernt und abschließend vorsichtig unter langsamen axialen Drehbewegungen das Implantat aus dem Markraum der rechten Tibia gezogen. Während der Präparation wurde die Tibia mit den Fingern proximal so fixiert, dass der Frakturspalt keinerlei Belastung ausgesetzt war.

Bis zur biomechanischen Testung wurden beide Tibiae in feuchte Mullkompressen eingewickelt, die mit isotoner Kochsalzlösung getränkt waren, um das Knochengewebe vor Austrocknung zu schützen.

2.8 Biomechanische Testung

2.8.1 Verwendete Materialien

- Flüssigkeit: 1000 ml, Technovit® 3040 (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Pulver: 1000 g, Technovit® 3040 (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- 10 ml-Einmal-Spritzen
- Haltevorrichtung
- Winkel DIN 875/1 (ORION, Deutschland)
- Transportklemme
- Visiervorrichtung
- Schublehre
- Plaster: Leukosilk® (Beiersdorf, Hamburg, 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 (siehe Abb. 9)
- Materialprüfmaschine 1455 (Zwick®, Ulm, Deutschland)
- Messkraftverstärker Typ MCG (Fa. HBM, Darmstadt, Deutschland)
- Computer mit Software Catman 32® (Fa. HBM, Darmstadt, Deutschland), Zwick® (Ulm, Deutschland), Excel (Microsoft, USA)
- Drucker

2.8.2 Torsionsmaschine

Die Torsionsmaschine ist eine für diese Versuche speziell konstruierte Maschine, mit der man das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit der Tibia bestimmen kann.

Sie ist aus Aluminium gefertigt und auf einer Bodenplatte befestigt und wird zur Testung mit der Zwick®-Maschine kombiniert, in die die Torsionsmaschine vor der Testung genau positioniert und fixiert wurde (siehe Abb. 9).

Im Einzelnen besteht der Testungsaufbau aus (vgl. mit Abb. 9):

1. Zwei Einbettformen zur Fixierung der Knochen
2. Einer linearen Kraft, die durch eine Materialprüfmaschine (Zwick®) erzeugt wird (durch den Metallstift dargestellt)
3. Zwei Hebelarme für die Übertragung der Kraft auf die Rotationsachse
4. Zwei Nadellager zur Reibungsverminderung
5. Einer Kraftmessdose zur Bestimmung des Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit mit einem Verbindungskabel zum Computer für die Auswertung
6. Einem Gewicht als axiale Vorlast (5 N)
7. Computer mit der Catman-Software (nicht abgebildet für die Berechnung des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit)

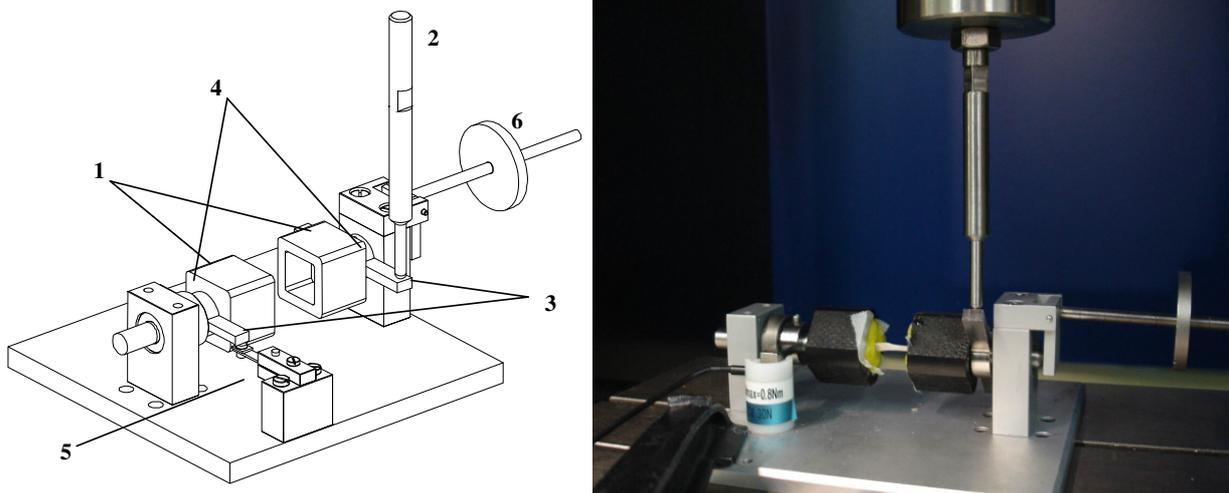


Abb. 9: Torsionsmaschine in Kombination mit der Zwick®-Maschine (dargestellt mit Metallstift, Nr. 2)

2.8.3 Einbetten der Tibiae

Zur biomechanischen Testung mussten jeweils die frakturierte rechte und die nicht-frakturierte linke Tibia in spezielle Gussformen mit Beracryl (Technovit 3040®) eingebettet werden, um den Knochen anschließend in die Torsionsmaschine einspannen zu können.

Zunächst wurde der distale Teil der Tibia in der Gussform fixiert. Dazu wurde der proximale Anteil mit einer speziellen Haltekonstruktion so eingespannt, dass vor allem der mittlere bzw. mit Kallus bedeckte frakturierte Abschnitt des Knochens in achsengerechter, senkrechter und zentraler Stellung positioniert wurde. Der distale Anteil ragte frei in die noch leere Gussform.

Um diese optimale Stellung zu erreichen, wurde eine spezielle Visiervorrichtung aus Plexiglas verwendet. Diese besteht aus zwei senkrecht zueinander stehenden Scheiben (3 cm x 1,5 cm x 0,5 cm), in dessen Mitte jeweils ein vertikaler Strich eingeschliffen wurde, um damit entlang der Tibiadiaphyse eine virtuelle Achse anlegen zu können.

In optimaler Stellung der Tibia wurde der Beracryl-Zement bis zum oberen Rand der Form eingelassen.

Nach Aushärten des Zements (ca. 20 min) wurde zum Einbetten des proximalen Knochenanteils der bereits eingebettete distale Anteil in die Haltevorrichtung eingespannt, so dass nun das proximale Stück frei in einer noch leeren Gussform hing, die dann erneut mit Beracryl ausgefüllt wurde.

Dabei war erneut auf die zentrale Stellung und einen Abstand von 1,8 cm zwischen den beiden Gussformen zu achten, welcher mit einer Schublehre bestimmt wurde (siehe Abb. 10).

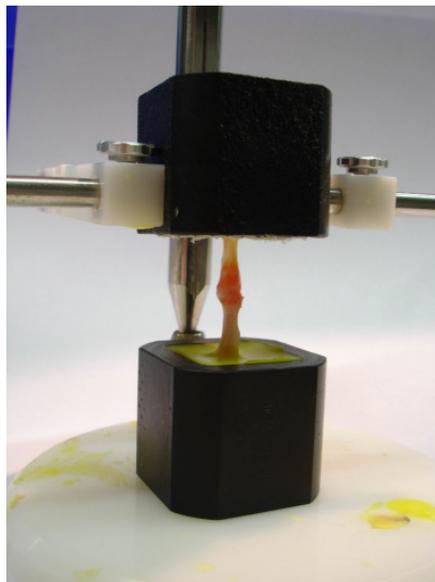


Abb. 10: Einbettung des frakturierten Knochens

Während des gesamten Einbettungsvorganges wurde der Knochen mit isotoner Kochsalzlösung feucht gehalten, um das Austrocknen von Knochen und Kallus zu verhindern.

Für den Transport der eingebetteten Tibia zur Torsionsmaschine wurde eine spezielle Transportklemme verwendet, die jegliche Belastung auf den Knochen bzw. Kallus verhindern sollte.

2.8.4 Torsionale Testung

Zur Bestimmung des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit wurde die eingebettete Tibia in die Torsionsmaschine eingespannt.

Die beiden Gussformen wurden dabei so fixiert, dass deren Längsachse mit der Rotationsachse parallel verlief. Mit einer axialen Vorlast von 5 N wurde der Knochen belastet. Durch die Vorlast wurde auf den Knochen ein gleichmäßiger Druck in allen Bereichen des Knochens ausgeübt, so dass die bei der torsionalen Testung auftretenden Zugbelastungen, die aus Längenänderungen resultierten, minimiert wurden.

Die Torsionsmaschine wurde mit einer Materialprüfmaschine der Firma Zwick® kombiniert. Diese Zwickmaschine brachte in linearer Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit eine konstante Kraft auf, die durch die Torsionsmaschine in eine Drehbewegung umgewandelt wurde. Dies geschah über einen Hebelarm, der die Torsionsbewegung auf den zu prüfenden Knochen ausübte.

Das erzeugte Torsionsmoment wurde am anderen Ende des Knochens über einen zweiten Hebelarm, der einer Kraftmessdose auflag, gemessen. Diese Kraftmessdose wurde mit einem Computer verbunden und mithilfe der Software Catman 32® war es möglich, die Ergebnisse auf dem Computerbildschirm zu registrieren, graphisch darzustellen und für die spätere Auswertung zu speichern.

Das Programm berechnete aus der aufgebrachten Kraft und dem wirksamen Hebelarm das Torsionsmoment und zeigte dieses in einem Diagramm in Relation zur Zeitachse. Bei der Testung wurde das erzeugte Torsionsmoment solange gemessen, bis der Knochen nachgab. Die Prüfmaschine stoppte den Vorgang sofort, wenn ein Widerstandsverlust von 8% auftrat.

Diese Testung wurde jeweils mit der nicht-frakturierten linken und anschließend mit der frakturierten rechten Tibia durchgeführt.

2.8.5 Auswertung der Computerdaten

Aus den mit Catman 32® gespeicherten Messdaten wurde abschließend das maximale Drehmoment (Hebelarmlänge x Kraftwirkung [Nmm]) und die torsionale Steifigkeit (Drehmoment/Winkeländerung [Nmm/°]) mit Hilfe eines speziellen Auswertungsprogramms bestimmt.

Pro Testung wurden ca. 5000 Werte-Paare gemessen und in einem Diagramm dargestellt. Auf der X-Achse wurden die Winkeländerung [°] und auf der Y-Achse das Drehmoment [Nmm] aufgetragen. Die Steigung $[m = \frac{Y_b - Y_a}{X_b - X_a}]$ des Graphen spiegelte per definitionem die Steifigkeit des Knochens wieder. Mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden, die mit dem Auswertungsprogramm an den Graphen anlegen werden konnte, wurde die Steigung bestimmt und somit die torsionale Steifigkeit (siehe Abb. 11).

Das maximale Drehmoment wurde aus dem höchsten gemessenen Punkt des Graphen abgelesen.

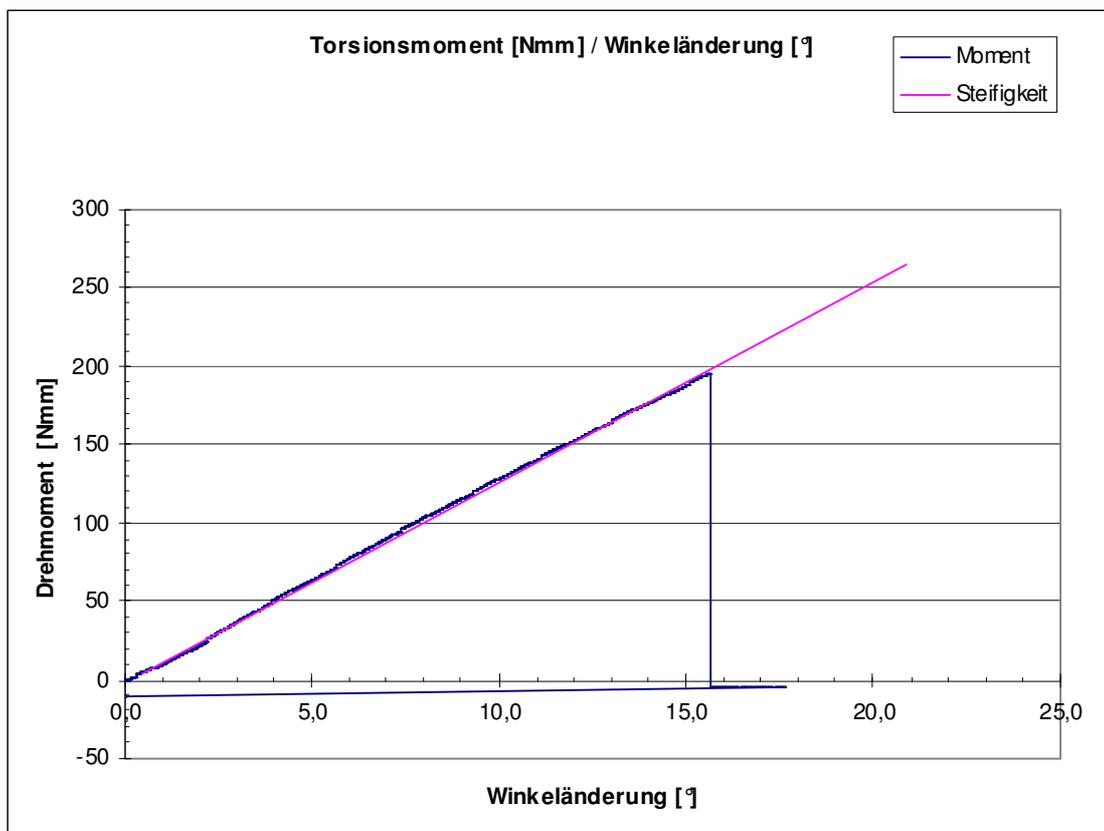


Abb.11: Exemplarische Darstellung einer biomechanisch getesteten Tibia, aus der die torsionale Steifigkeit und das maximale Drehmoment bestimmt werden können.

Die Ergebnisse des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit des frakturierten Knochens wurden jeweils ins Verhältnis mit dem unfrakturierten Knochen gesetzt und somit in Prozent ausgedrückt, um die Werte vergleichen zu können:
(Drehmoment bzw. Steifigkeit frakturiert / Drehmoment bzw. Steifigkeit unfrakturiert) x 100

2.9 Histomorphologische / Histomorphometrische Auswertung

2.9.1 Knochenaufbereitung

2.9.1.1 Verwendete Materialien

Fixierung:

- Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette, Quantity 125 (Sakura, USA)
- Fixierlösung: 324 ml Formaldehyd (37%), 550 ml Alkohol (100%), 130 ml Barbitol-Na-Puffer (0,1 molar, pH 7,3), 6 g Glucose
- Schüttler HS 501 digital (KIKA Labortechnik)

Entwässerung:

- 70% - 80% - 96% - 100% Alkohol
- Xylol, Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)

Einbettmedium:

- Technovit 9100 neu Haraeus Kulzer GmbH (Wehrheim, Deutschland)
- spezielle Einbettungsformen

2.9.1.2 Durchführung

Den ersten Schritt der Knochenaufbereitung stellte die Fixierung dar, um die intra- und supravitalen Stoffwechselprozesse zu unterbrechen und die postmortalen Zerfallerscheinungen zu verhindern.

Die Knochen wurden dazu in spezielle Plastikkassetten gelagert, deren Boden und Deckel für die Fixierlösung durchlässig waren. Anschließend wurden jeweils vier der Kassetten in ein mit der Fixierlösung befülltes verschließbares Glas gelegt, in dem sie für 3 bis 4 Tage auf einem Schüttler verblieben.

Nach der Fixierung wurden die Präparate für ca. 10 min mit Leitungswasser gespült und anschließend in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Um Schrumpfungen oder ein Zerreißen der Präparate zu verhindern, erfolgt dieser Vorgang stufenweise, indem man von schwach- zu hochprozentigem Alkohol überging (von 70%igem bis 100%igem Alkohol für jeweils 7 Tage).

Anschließend erfolgte als dritter Schritt die eintägige Entfettung des Gewebes mit Xylol, welches als Intermedium zwischen dem Prozess der Entwässerung und der Infiltration diente.

Für die Hartschnitt-Technik zur Herstellung von Dünnschichten eignet sich speziell Technovit 9100 neu, einem Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat. Zunächst

wurde das Gewebe für 7 Tage bei Raumtemperatur präinfiltriert, gefolgt von einer 7 tägigen Infiltration mit Technovit 9100 neu nach Angaben des Herstellers.

Abschließend wurden die Tibiae eingebettet. Dazu wurden die Präparate in spezielle Einbettformen gelegt, die anschließend mit dem Technovit-Einbettgemisch befüllt wurden.

2.9.2 Herstellung der histologischen Schnitte

2.9.2.1 Verwendete Materialien

- Objektträger HistoBond® 75 x 25 x 1 mm, ISO-Norm 8037/1, Paul Marienfeld, Laboratory Glassware (Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Schleifscheiben Discs, WS-Flex 18-C SK, 250 mm, P 60, Ident-Nr.: 00223433, Hermes, Walter Messner GmbH (Oststeinbek/Hamburg, Deutschland)
- Schneideflüssigkeit, Fa. WIV (Schwetzingen, Deutschland)
- Streckflüssigkeit (30 ml Butoxyethyl-Acetat + 70 ml 70%iger Alkohol)
- Kisol-Folie (0,025 x 95 x 95 mm, farblos), Medim, Histotechnologie GmbH (Gießen, Deutschland)
- Filterpapier (58 x 58 cm)
- Pinzette fein
- 2 Pinsel fein

Geräte:

- Handschleifgerät Phoenix 3000, Jean Wirtz, Laborgeräte Vertriebs GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
- Mikrotom SM 2500S, Leica Instruments GmbH (Nussloch, Deutschland)
- Schneidemesser Hartmetall, Schliff 16 cm, Leica Instruments GmbH (Nussloch, Deutschland)
- Presse (Eigenentwurf)
- Wärmeschrank Function line, Typ: B12, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)

2.9.2.2 Durchführung

Um mit dem Mikrotom die endgültigen histologischen Schnitte anfertigen zu können, mussten die Kunststoffblöcke, in denen sich die Rattentibiae befanden, zunächst so zurechtgeschliffen werden, dass die Schnitte auf den Objektträger passten.

Der passend geschliffene Block wurde zum Schneiden in das Mikrotom fest eingespannt, so dass er waagrecht zum Messer lag.

Nach optimaler Einstellung des Präparates zum Schneidemesser wurde vom Kunststoffblock und vom Knochen soviel Schnitte abgenommen bis die Zielebene erreicht war. Während des Schneidevorgangs wurde sowohl der Block als auch das Messer permanent mit Schneidflüssigkeit benetzt. Die Zielebene zeichnete sich durch das Erreichen des Markraums beider Frakturrenden aus.

In dieser Zielebene wurden ca. 10 Schnitte (Dicke von 6 µm) mit einer feinen Pinzette vorsichtig abgenommen und auf vorbereitete, mit 70%igem Alkohol betröpfelte Objektträger, gelegt.

Anschließend wurden die Schnitte mit Streckflüssigkeit benetzt und mit zwei feinen Pinseln vorsichtig auseinander gezogen, um eine eventuell entstandene Faltenbildung zu beseitigen.

Über das gestreckte Präparat wurde eine Kisol-Folie gelegt und der überschüssige Alkohol mit einem Filterpapier entfernt, bevor die Schnitte für 2 Tage bei 60 °C im Brutschrank gepresst wurden, um eine vollständige Haftung der Schnitte auf dem Objektträger gewährleisten zu können.

2.9.3 Färbung der histologischen Schnitte

2.9.3.1 Verwendete Materialien

- Glasküvetten
- Färbegestell für 10 Objektträger
- Deckgläser, 24 x 32 mm, Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG (Braunschweig, Deutschland)

Lösungen:

- (2-Methoxyethyl)-Acetat (Merck-Schuchardt; Hohenbrunn; Deutschland)
- 100%iger Alkohol (Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig; Deutschland)
- 96% - 80% - 70% - 40%iger Alkohol (werden mit Aqua dest. entsprechend verdünnt)
- Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland)

- 3%ige wässrige Silbernitrat-Lösung (Merck; Darmstadt; Deutschland)
- Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung, min. 37% (Merck KgaA; Darmstadt; Deutschland)
- 5% Natriumthiosulfat-Lösung (Merck; Darmstadt; Art.Nr. 6516, Deutschland)
- 1%ige wässrige Methygrün-Lösung (Merck; Darmstadt; Deutschland)
- Pikrofuchsin-Lösung van Gieson (Division Chroma; Münster; Deutschland)
- Xylol (Merck KgaA; Darmstadt; Deutschland)
- Vitro Clud (R. Langenbrinck; Emmendingen, Deutschland)

2.9.3.2 Durchführung

Zur Färbung der histologischen Schnitte verwendeten wir! zum einen die Versilberung nach von Kossa (siehe Abb. 12) und zum anderen die Färbung mit Methylgrün/van Gieson (siehe Abb. 13).

Versilberung nach von Kossa:

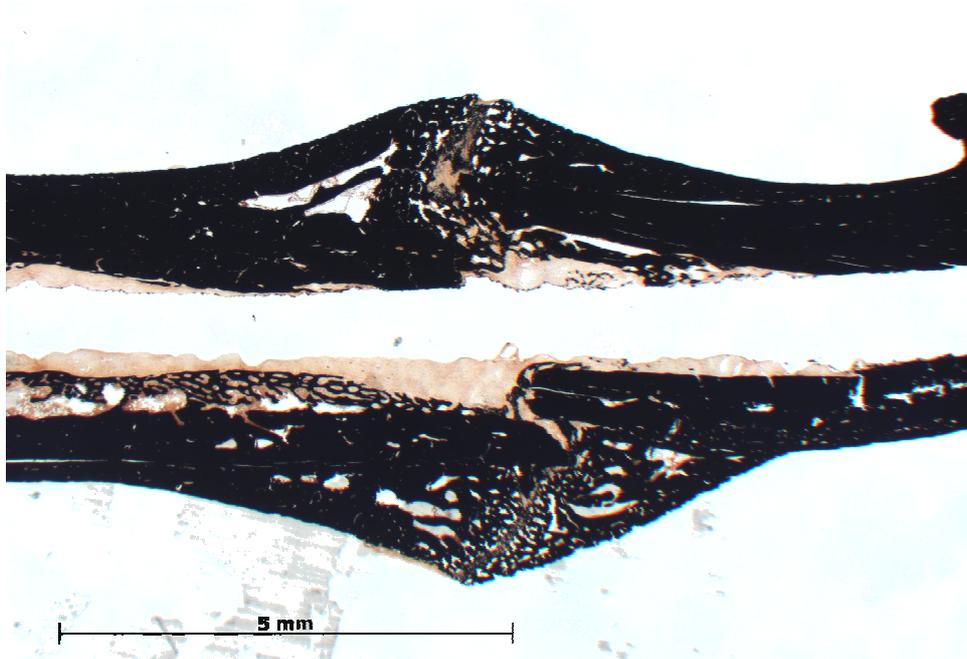


Abb. 12: Histologischer Schnitt einer Rattentibia mit der Versilberung nach von Kossa.

Färbeergebnis:

Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe:	schwarz
Mineralisationsfronten:	schwarz granuliert
Knorpel und anderes Gewebe:	braun

Diese Färbemethode dient der Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe sowie den Mineralisationsfronten.

Zunächst wurden die Schnitte in einer (2-Methoxyethyl)-Acetat-Lösung (MEA) entplastet, die Kisol-Folie vom Objektträger entfernt und in absteigender Alkoholreihe (100 – 96 – 80 – 70%igem Alkohol) entwässert.

Anschließend erfolgte die Färbung zunächst für 5 Minuten in 3%iger wässriger Silbernitratlösung, dreimaliges Spülen in Aqua det. und zweiminütiger Reduktion in einer Natrium-Formaldehydlösung. Nach 10 Minuten Wässern mit Leitungswasser verblieben die Schnitte für 5 Minuten in 5%igem Natriumthiosulfat. Anschließend erneutes Wässern mit Leitungswasser und Spülung mit Aqua dest. mit nachfolgender Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70 – 80 – 96 – 100%igem Alkohol) und Entfettung in Xylol für weitere 10 Minuten.

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in Vitro Clud eingedeckt.

Methylgrün/van Gieson -Färbung:



Abb. 13: Histologischer Schnitt einer Rattentibia mit der Methylgrün/van Gieson-Färbung

Färbeergebnis:

Knorpel: grün

Knochen weinrot

Diese Färbung dient der Darstellung von Knorpelgewebe.

Der Vorgang des Entplastens und der Entwässerung erfolgte zunächst nach dem gleichen Schema wie bei der Versilberung nach von Kossa. Die Anfärbung des Knorpels erfolgte für 40 Minuten in Methylgrün und anschließend für zwei Minuten im van Gieson-Gemisch.

Dann erneute Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Entfettung mit Xylol und Eindecken in Vitro Clud.

2.9.4 Auswertung der histologischen Schnitte

2.9.4.1 Verwendete Materialien

- Mikroskop: Leica DM R (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Objektiv, Vergrößerung 1,6 mm
- Kamera: AxioCam MRc5 Carl Zeiss
- Bildanalyseprogramm Zeiss KS 400

2.9.4.2 Durchführung

Mit Hilfe eines speziellen Bildanalyseprogramms war es möglich, die einzelnen histologischen Schnitte histomorphometrisch auszuwerten. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops, das mit einer Kamera versehen war, wurden die Präparate zunächst einzeln aufgenommen und auf einem Computer für die spätere Auswertung gespeichert.

Sowohl der distale als auch der proximale Anteil des Frakturspalts wurden auf folgende Parameter hin mit dem Bildanalyseprogramm untersucht (in Klammern jeweils die Parameter der Methylgrün/van Gieson-Färbung):

- Kortikalis: Fläche, Knochen (Knorpel), Knochen (Knorpel)/Fläche
- Periostaler Kallus: Fläche, Knochen (Knorpel), Knochen (Knorpel)/Fläche
- Endostaler Kallus: Fläche, Knochen (Knorpel), Knochen (Knorpel)/Fläche
- Tibiadurchmesser (Baseline)

Die jeweiligen Abschnitte der Tibia bzw. des Frakturbereichs konnten mit Hilfe des Bildanalyseprogramms farblich markiert werden, d.h. es wurden jeweils die Kortikalis, der periostale Kallus und der endostale Kallus farblich markiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Tibiadurchmessers (Baseline), der definiert ist von der Außenseite der ventralen Kortikalis bis zur Außenseite der dorsalen Kortikalis. Aus dieser Baselinie

wurde die „Region of Interest“ (ROI) berechnet, wobei es sich um einen von der Fläche genau definierten Bereich handelt, in der die Größe und Zusammensetzung des Knochens bzw. Knorpels berechnet wurde. Die Ausdehnung der ROI nach proximal und distal definiert sich als 1,5 fache Länge der Baseline und umfasst in der Breite des gesamten Kallusausschnitt (siehe Abb. 14).

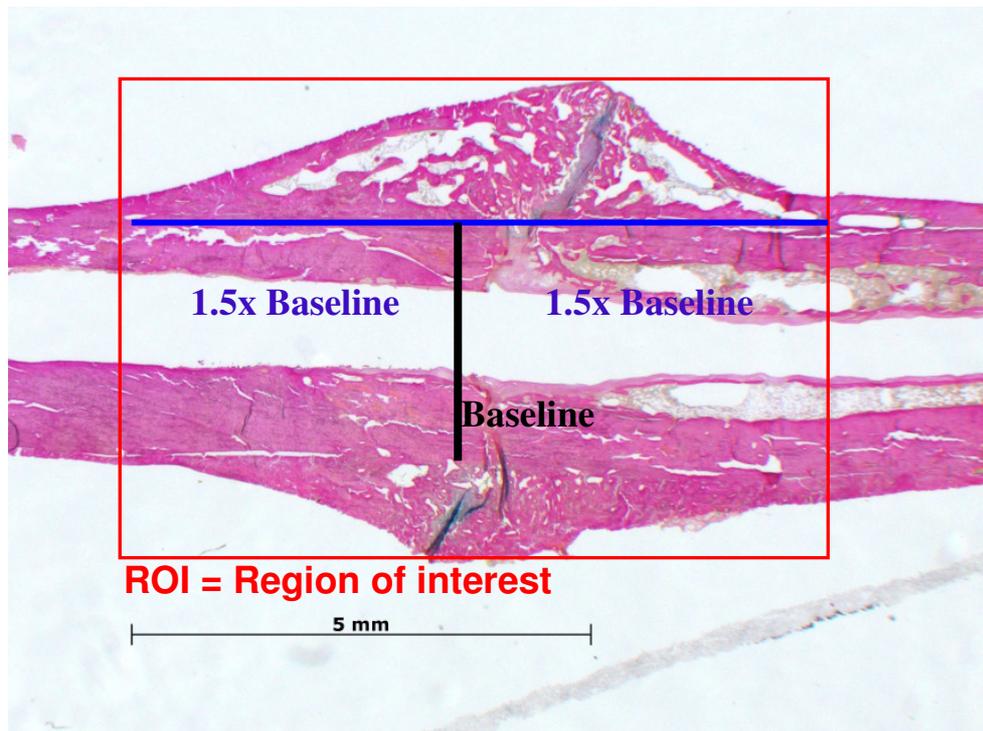


Abb. 14: Darstellung der Baseline und der Region of Interest für die Bildanalyse

Versilberung nach von Kossa:

Bei der Auswertung dieser Färbemethode berechnete das Programm den mineralisierten Anteil des Knochens/Knorpels in den jeweiligen markierten Abschnitten der Tibia. Der mineralisierte Anteil wurde durch die Versilberung nach von Kossa schwarz dargestellt, nicht-mineralisierter Knorpel und Bindegewebe braun.

Methylgrün/van Gieson-Färbung:

Aus den mit Methylgrün/van Gieson angefärbten Schnitten berechnete das Programm den Knorpelanteil in den jeweiligen Tibiaabschnitten, der grün dargestellt wurde. Im Gegensatz dazu stellte sich Knochen weinrot dar.

Die computergestützte Auswertung der verschiedenen Gewebe basiert auf der automatischen Erkennung der unterschiedlichen Anfärbungen. Jedoch war eine Überprüfung am Mikroskop immer nötig und eine eventuelle manuelle Korrektur der markierten Gewebeareale möglich.

2.10 Statistik

Für die statistische Auswertung der biomechanischen und histomorphometrischen Daten wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-Test angewandt, da es sich bei den Ergebnissen der einzelnen Gruppen um unabhängige, nicht-parametrisch verteilte Daten handelte.

Anschließend wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet.

Für die Berechnung der statistischen Daten wurde die Statistiksoftware SPSS® (Version 14.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Ausfälle

Während der Operation der Tiere starben 2 aufgrund einer zu hohen Dosis an Narkotikum.

7 Tiere mussten aufgrund einer komplexen Trümmerfraktur der rechten Tibia, die nicht mit dem Kirschner-Draht ausreichend stabilisiert werden konnte, getötet werden.

Im postoperativen Verlauf trat bei 5 Tieren eine Implantatlockerung bzw. eine Marknagelwanderung auf.

2 Tiere verstarben während der Standzeit im Käfig ohne erkennbare Ursache und eine Tibia wurde bei der Präparation beschädigt, dass sie nicht mehr der Auswertung zugeführt werden konnte.

3.2 Körpergewicht und Körpertemperatur

Präoperativ, am 7., 14., 28 und am 42. Tag wurden bei den Versuchstieren die Körpertemperatur und das Gewicht bestimmt (siehe Tabelle 3).

Dabei zeigen die Messergebnisse bei der mittleren Körpertemperatur und auch beim mittleren Körpergewicht während der Versuchsperiode keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen.

Im postoperativen Verlauf ist in 4 der 5 Gruppen nach 7 Tagen zunächst eine leichte Gewichtsabnahme zu erkennen, anschließend zeigt sich in allen Gruppen eine Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zum Ausgangswert.

Die Körpertemperatur bleibt im postoperativen Verlauf nahezu unverändert, somit gibt es keinen Anhalt für eine systemische oder lokale Infektion.

Tabelle 3: Gewicht und Temperatur während des Untersuchungszeitraums

Gewicht [g]	Tag 0 / präOp	Tag 7	Tag 14	Tag 28	Tag 42
Unbeschichtet	248,4 ± 8,6	242,0 ± 17,2	250,2 ± 12,4	262,1 ± 14,7	270,1 ± 13,1
PDLLA	244,7 ± 6,7	241,0 ± 9,6	245,7 ± 11,6	261,1 ± 11,1	268,9 ± 16,5
Simvastatin low dose	246,2 ± 10,6	242,9 ± 10,6	255,2 ± 8,0	255,8 ± 12,4	270,4 ± 13,6
Simvastatin high dose	243,4 ± 9,1	246,7 ± 9,8	255,6 ± 16,7	263,1 ± 13,8	271,1 ± 7,0
BMP-2	250,3 ± 8,2	247,4 ± 11,3	252,7 ± 8,8	260,9 ± 6,7	276,2 ± 9,5
Temperatur [°C]	Tag 0 / präOp	Tag 7	Tag 14	Tag 28	Tag 42
Unbeschichtet	35,4 ± 0,8	35,9 ± 0,9	36,0 ± 0,6	35,8 ± 0,5	36,0 ± 0,5
PDLLA	35,5 ± 0,7	35,7 ± 0,4	35,8 ± 0,5	35,9 ± 0,8	36,1 ± 0,7
Simvastatin low dose	35,3 ± 1,2	35,7 ± 1,0	35,8 ± 0,4	35,6 ± 0,8	36,0 ± 0,9
Simvastatin high dose	34,9 ± 1,0	36,0 ± 0,7	35,9 ± 0,6	35,8 ± 0,6	36,1 ± 0,8
BMP-2	34,7 ± 0,8	36,0 ± 0,5	36,0 ± 0,6	36,3 ± 0,5	36,1 ± 0,6

3.3 Radiologische Untersuchungen

3.3.1 Einteilung nach der AO-Klassifikation

Die postoperativ angefertigten Röntgenbilder der biomechanisch getesteten 45 Tiere wurden anhand der AO-Klassifikation eingeteilt (siehe Abb. 15).

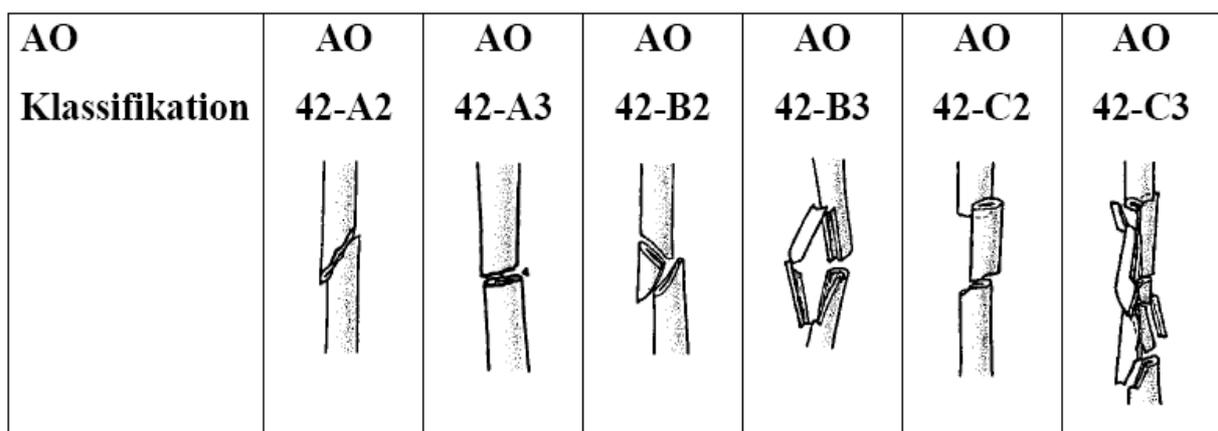


Abb. 15: Einteilung der Tibiaschaftfraktur nach der AO-Klassifikation

Bei 64% der ausgewerteten Versuchstiere zeigt sich im Röntgenbild eine Querfraktur mit glattem Frakturspalt, welcher nach der AO-Klassifikation einer 42-A3-Fraktur entspricht. 24% weisen einen schrägen Frakturspalt im Sinne einer Spiralfraktur auf (42-A2 nach AO-Klassifikation). Bei 9% der gesetzten Frakturen entstand eine Fraktur mit einem Biegungskeil (42-B2) (siehe Abb.16).

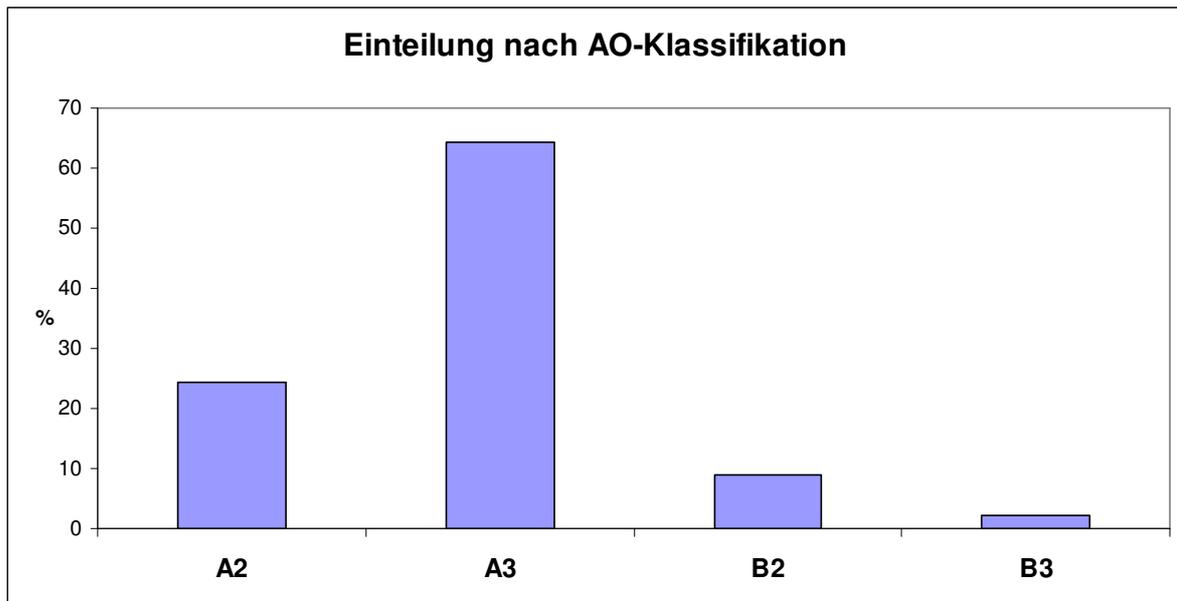


Abb. 16: Einteilung der biomechanisch getesteten Tiere in Anlehnung an die AO-Klassifikation

3.3.2 Radiologische Beurteilung der Kortikalisüberbrückung

Anhand der angefertigten Röntgenbilder nach 28 Tagen und am Tag der Knochenentnahme am 42. Tag wurde die Konsolidierung bzw. Überbrückung der Kortices beurteilt und klassifiziert (siehe Abb. 17). Dafür wurden die Röntgenbilder jeder einzelnen Tibia in beiden Ebenen (p.a. und lateral) ausgewertet.

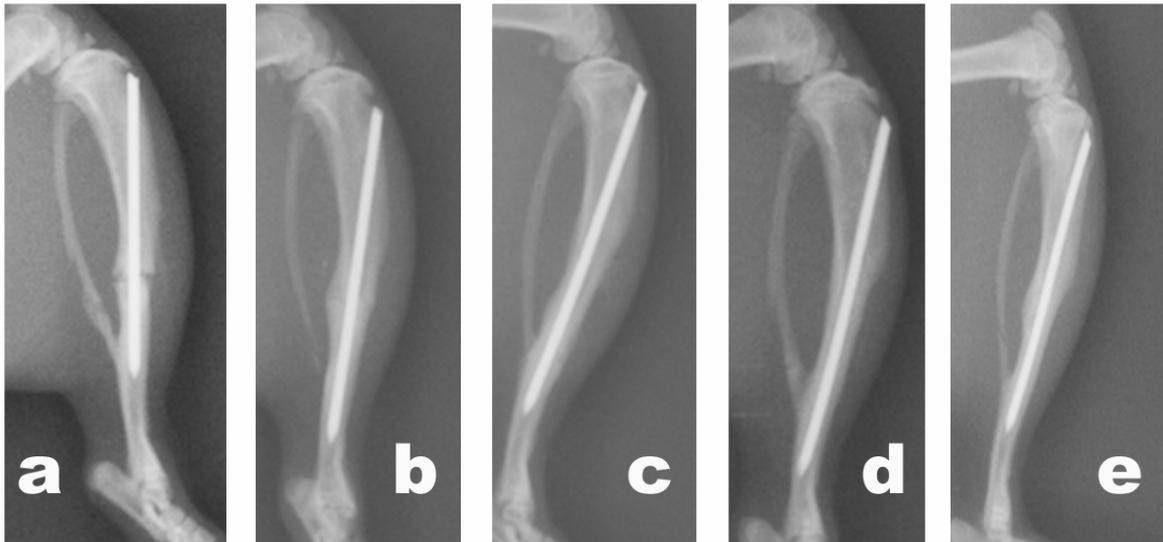


Abb. 17: Exemplarische Darstellung der Röntgenbilder (laterale Ebene) 42 Tage postoperativ, a) unbeschichtet b) PDLLA c) Simvastatin low dose d) Simvastatin high dose e) BMP-2

Die Konsolidierung der Kortices wurde von drei unabhängigen Beobachtern nach folgenden Parametern beurteilt:

- A** – Keine knöcherne Überbrückung
- B** – Inkomplette unilaterale Konsolidierung (Überbrückung einer bis drei Kortices)
- C** – Komplette Überbrückung (knöcherne Überbrückung aller vier Kortices)

Dabei zeigen sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Röntgen-Score im zeitlichen Verlauf nach 28 und 42 Tagen

		A: Keine Überbrückung	B: Inkomplette Überbrückung	C: Komplette Überbrückung
28 Tage	Unbeschichtet	5	4	0
	PDLLA	2	5	2
	Simva-low	1	6	2
	Simva-high	0	4	5
	BMP-2	0	8	1
42 Tage	Unbeschichtet	2	7	0
	PDLLA	1	4	4
	Simva-low	0	5	4
	Simva-high	0	4	5
	BMP-2	0	4	5

Bei den subjektiv beurteilten Röntgenbildern zeigt sich bereits nach 28 Tagen eine Zunahme der Konsolidierung bei den Gruppen, die mit beschichteten Nägeln versorgt wurden im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe. Die höchste Anzahl der Tiere, deren Kortices nach 28 Tagen vollständig überbrückt sind (C), weist die Simvastatin-high-dose-Gruppe auf (5 der 9 Tiere). Im Vergleich dazu gibt es in der unbeschichteten Gruppe kein einziges Tier mit einer vollständigen Überbrückung nach 28 Tagen.

Beim Vergleich der radiologischen Ergebnisse nach 28 Tagen und nach 42 Tagen ist zu erkennen, dass zum späteren Zeitpunkt mehr Tiere eine vollständige Überbrückung der Kortices aufweisen.

Nach 42 Tagen weisen die Tiere eine Zunahme der vollständigen Konsolidierung (C) auf, dessen Tibiae mit beschichteten Nägeln versorgt wurden (Gruppe II bis V), wobei es zwischen diesen Gruppen keine großen Unterschiede gibt.

Jeweils 5 Tiere der Simvastatin-high-dose-Gruppe und der BMP-2-Gruppe zeigen nach 42 Tagen eine vollständige Überbrückung aller vier Kortices. Lediglich die Tiere, die mit unbeschichteten Nägeln versorgt wurden (Kontrollgruppe), haben eine geringere Konsolidierung der Kortices (ein Tier mit keiner Überbrückung (A) und 7 Tiere mit einer inkompletten Überbrückung (B)).

3.4 Biomechanische Testung

Um die Stabilität des Knochens biomechanisch beurteilen und miteinander vergleichen zu können, wurden das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit jeder einzelnen Tibia bestimmt. Dabei wurden alle Daten der frakturierten Tibiae mit denen der unfrakturierten kontralateralen Tibiae direkt prozentual verglichen.

Die Ergebnisse nach 42 Tagen zeigen eine Zunahme des maximalen Drehmoments bei der Simvastatingruppe (high-dose) um 49,8% im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe. Die torsionale Steifigkeit weist eine Zunahme bei der Simvastatingruppe mit hoher Dosierung von 89,9% im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

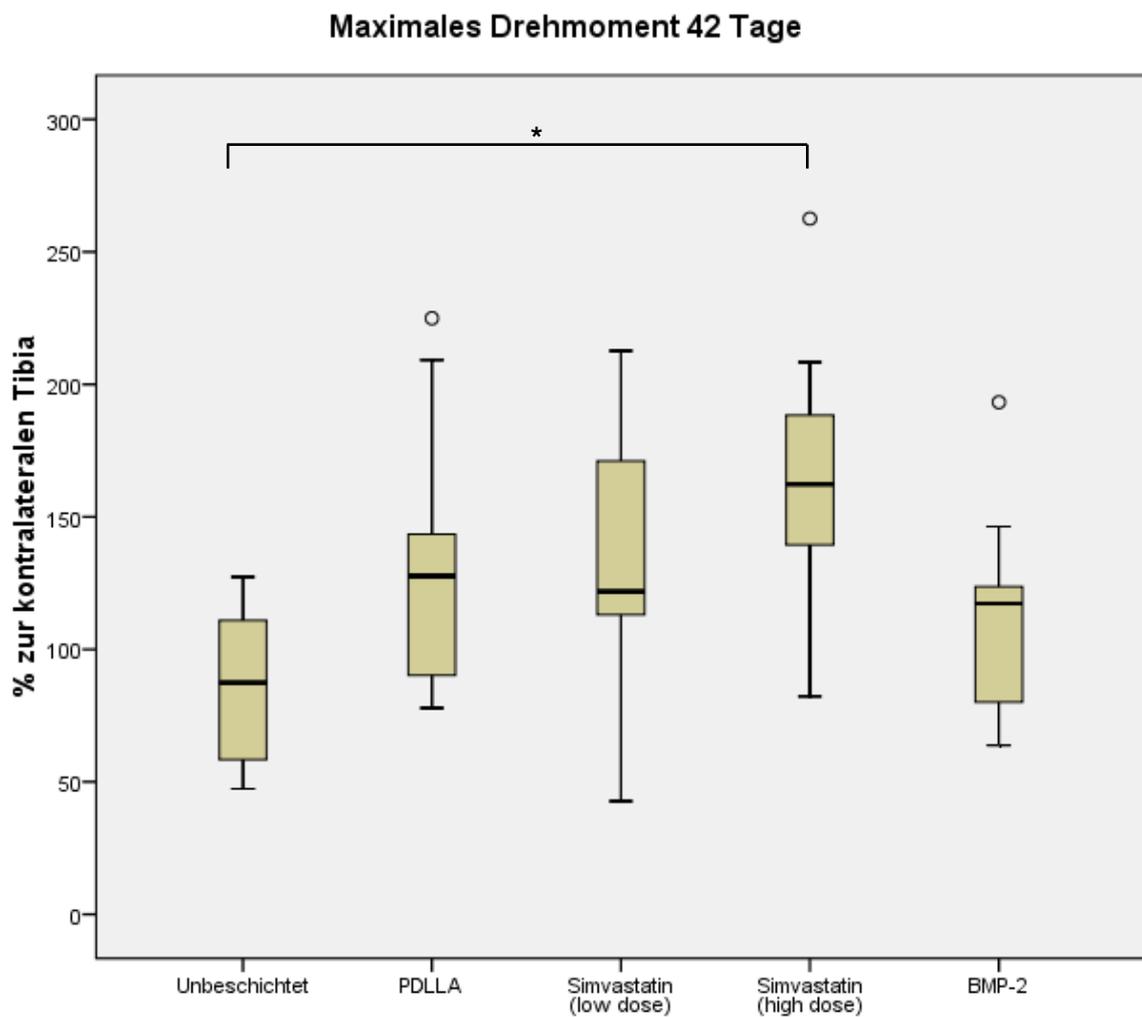
Dabei weist die Kontrollgruppe durchschnittlich einen Mittelwert (Wert der frakturierten Tibia im Verhältnis zum Wert der unfrakturierten Tibia) beim maximalen Drehmoment von 83,75% und eine Standardabweichung von $\pm 31,11$ und eine torsionale Steifigkeit von $82,19\% \pm 27,86$ auf. Die mit PDLLA beschichtete Gruppe zeigt ein maximales Drehmoment von $131,22\% \pm 54,73$ und eine torsionale Steifigkeit von $125,49\% \pm 44,92$. Ähnlich das Ergebnis der Simvastatin-low-dose-Gruppe mit einem

maximalen Drehmoment von $131,94\% \pm 51,47$ und einer torsionalen Steifigkeit von $125,48\% \pm 33,61$.

Die Ergebnisse der Simvastatin-high-dose-Gruppe ergaben ein maximales Drehmoment von durchschnittlich $164,45\% \pm 52,08$ und eine torsionale Steifigkeit von $156,08\% \pm 48,90$. Im Vergleich dazu die BMP-2-Gruppe mit einem maximalen Drehmoment von durchschnittlich $110,03\% \pm 42,36$ und einer torsionalen Steifigkeit von $153,52\% \pm 48,44$.

Statistisch ergibt sich dabei nach 42 Tagen ein signifikant ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, Bonferroni-Holm) höheres maximales Drehmoment und eine signifikant erhöhte torsionale Steifigkeit der Simvastatin-high-dose-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 18 und 19).

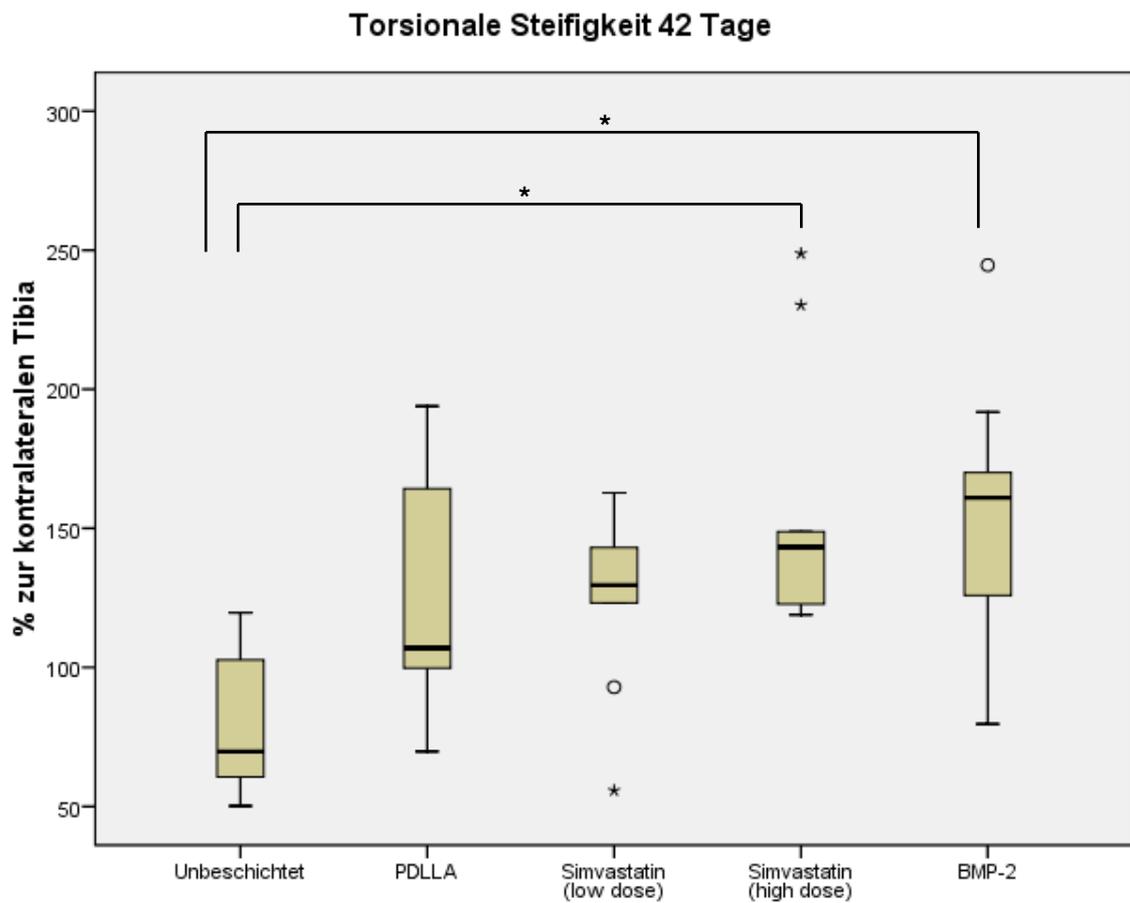
Die BMP-2-beschichtete Gruppe (Positivkontrollgruppe) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich eine signifikant erhöhte torsionale Steifigkeit (siehe Abb. 19).



* $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Bonferroni-Holm-Korrektur)

Abb.18: Biomechanisches Ergebnis des maximalen Drehmoments nach 42 Tagen.

Die Simvastatin-high-dose-Gruppe weist ein signifikant höheres maximales Drehmoment im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe auf.



* $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Bonferroni-Holm-Korrektur)

Abb. 19: Biomechanisches Ergebnis der torsionalen Steifigkeit nach 42 Tagen.

Es zeigt sich ein signifikant höheres Ergebnis bei der Simvastatin-high-dose-Gruppe und bei der BMP-2-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe.

3.5 Histomorphologische und histomorphometrische Auswertung

3.5.1 Histomorphologie

Die für die histologische Auswertung angefertigten 6 µm dicken Schnitte wurden zunächst histologisch subjektiv beurteilt.

Untersucht wurde dabei der Frakturbereich mit den Kortices sowie dem enchondralen und periostalen Kallus. Dabei wurde der Frakturheilungsprozess anhand der Methylgrün/van Gieson-Färbung und der Versilberung nach von Kossa beurteilt.

Bei der Methylgrün/van Gieson-Färbung wird Knorpel grün und Knochen weinrot dargestellt. In der Versilberung nach von Kossa erscheinen mineralisierter Knochen und Knorpel schwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und nicht-mineralisierter Knorpel und andere Gewebe braun.

Nachfolgend eine exemplarische Darstellung der Schnitte der einzelnen Gruppen 42 Tage nach Fraktur (siehe Abb. 20 a-e und 21 a-e).

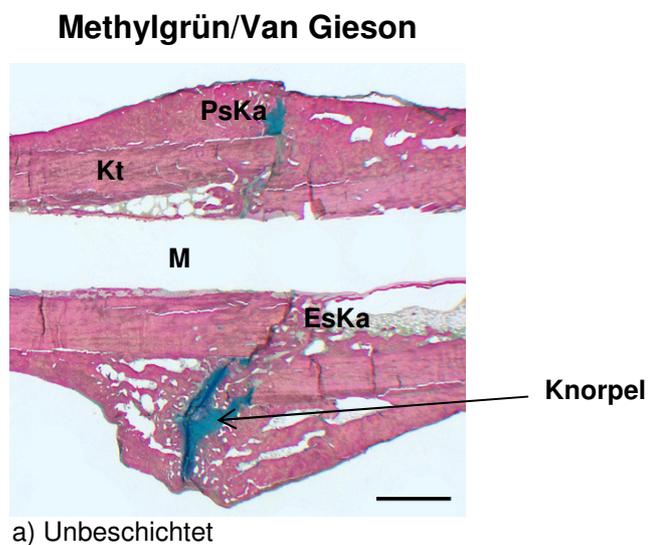
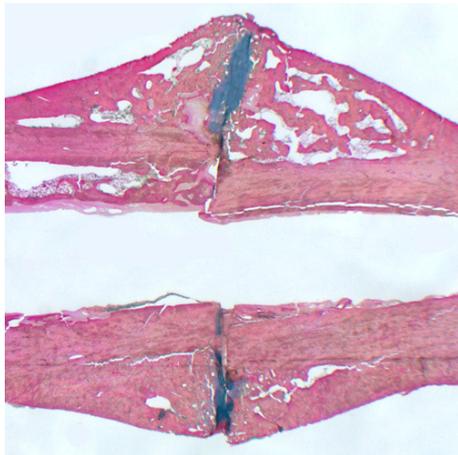
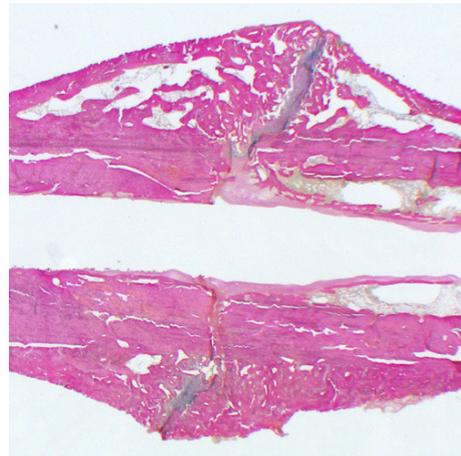


Abb. 20 a: Histologisch sagittaler Schnitt der Gruppe I in der Methylgrün/van Gieson-Färbung, Knorpelige Anteile stellen sich grün dar, mineralisierter Knochen rot.

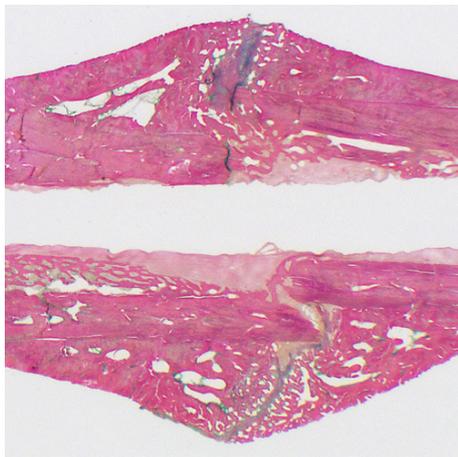
Scale bar: 1 mm. PsKa: Periostaler Kallus, Kt: Kortikalis, M: Markraum, EsKa: Endostaler Kallus



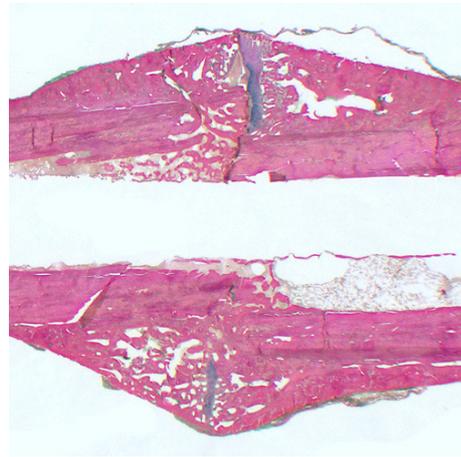
b) PDLLA



c) Simvastatin low dose



d) Simvastatin high dose



e) BMP-2

Abb. 20 b-e: Histologische sagittale Schnitte der Tibiae der Gruppen II bis V nach 42 Tagen in der Methylgrün/van Gieson-Färbung.

Versilberung nach von Kossa

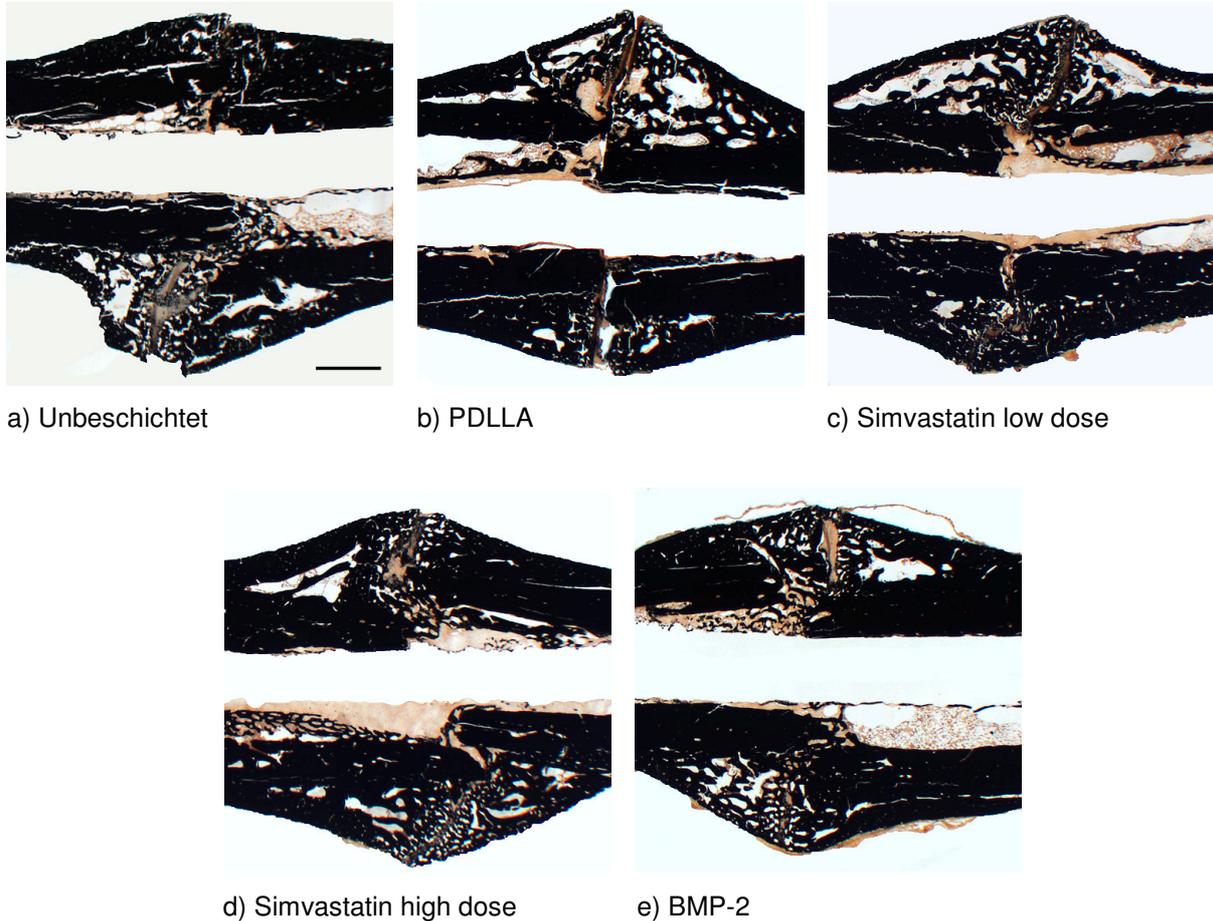


Abb. 21 a-e: Histologische sagittale Schnitte der Tibiae der einzelnen Gruppen nach 42 Tagen in der Versilberung nach von Kossa. Mineralisierter Knochen und Knorpel erscheinen schwarz, nicht-mineralisierter Knorpel und Bindegewebe braun. Scale bar: 1 mm.

Dabei zeigen die histologischen Bilder der untersuchten Tiere 42 Tagen nach Fraktur in allen Gruppen eine vergleichbare Kalluszusammensetzung. In allen Kallusbereichen sind neu mineralisierter Knochen, Knorpel und Bindegewebe zu sehen.

Es kommt in keiner der Gruppen zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung der Kortices, so dass sich der Frakturspalt in allen Schnitten noch darstellt.

Nach 42 Tagen ist in der Frakturzone der Prozess der enchondralen und der intramembranösen Ossifikation noch zu erkennen. In allen Schnitten ist der periostale Kallus deutlich abzugrenzen, die kleinere Fläche des enchondralen Kallus ist aufgrund der Lage des Nagels im Markraum nicht immer klar zu beurteilen, wobei in der Größe der Kallusse keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen sind.

Im Bereich des knöchernen periostalen Kallus sind zahlreiche Osteoidsäume mit aufliegenden Osteoblasten und im knorpeligen Kallusbereich zahlreiche Chondrozyten zu erkennen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich v.a. bei der Simvastatin-high-dose-Gruppe und in der BMP-2-Gruppe ein fortgeschrittenes Kallusremodelling. In diesen beiden Gruppen ist ein geringerer Knorpelanteil v.a. im periostalen Kallus zu erkennen und ein Zunahme an mineralisiertem Knochen, welches für eine bereits fortgeschrittenen Heilungsprozess im Frakturbereich spricht. Im Gegensatz dazu ist in der unbeschichteten Kontrollgruppe ein höherer Knorpelanteil festzustellen als in den anderen Gruppen (siehe Abb. 22).

Dabei zeigen sich, unabhängig von der Versuchsgruppe, keine Anzeichen für Osteolysen oder Infektionen.

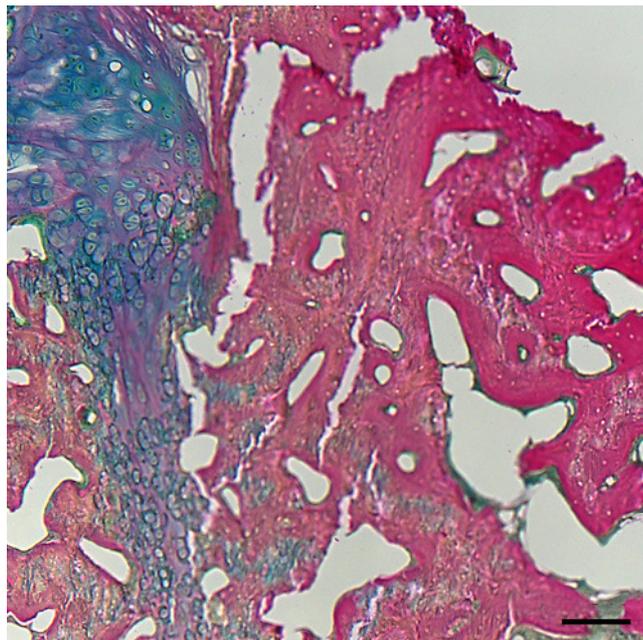


Abb. 22: Sagittaler Schnitt einer Rattentibia der unbeschichteten Gruppe, gefärbt mit Methygrün/van Gieson. Deutlich zu erkennen der Knorpelanteil mit zahlreichen Chondrozyten (grün/blau dargestellt). Scale Bar: 0,1 mm.

3.5.2 Histomorphometrie

Mit der Bildanalyse wurden die einzelnen Schnitte histomorphometrisch ausgewertet. Anhand der Färbungen ließen sich die jeweiligen Gewebetypen in den unterschiedlichen Bereichen der Frakturzone differenzieren und innerhalb der bereits beschriebenen Region of Interest (ROI) auswerten.

Dabei wurden folgende histomorphometrische Parameter bestimmt:

Versilberung nach von Kossa:

- Tibiadurchmesser (Baseline)
- Gesamtkallus: Fläche, Knochen, Knochen / Fläche
- Kortikalis: Fläche, Knochen, Knochen / Fläche
- Periostaler Kallus: Fläche, Knochen, Knochen / Fläche
- Endostaler Kallus: Fläche, Knochen, Knochen / Fläche

Methylgrün/van Gieson-Färbung:

- Knorpelfläche: gesamter, periostaler Kallus und endostaler Kallus
- Knorpelanteil / Kallus: gesamt, periostal, endostal

Es zeigten sich bei der histomorphometrischen Auswertung folgende Ergebnisse (Tab. 5-9):

Baseline

Tab. 5

	Unbeschichtet	PDLLA	Simvastatin low dose	Simvastatin high dose	BMP-2
Tibiadurchmesser (mm)	2,59 ± 0,15	2,56 ± 0,24	2,44 ± 0,24	2,68 ± 0,19	2,57 ± 0,19

Kortikalis

Tab. 6

	Unbeschichtet	PDLLA	Simvastatin low dose	Simvastatin high dose	BMP-2
Gesamtfläche Kortikalis (mm²)	9,04 ± 1,13	9,09 ± 1,87	7,57 ± 1,39	9,29 ± 1,60	9,36 ± 1,20
Knöcherne Fläche Kortikalis (mm²)	8,85 ± 1,23	8,79 ± 1,95	7,32 ± 1,55	9,08 ± 1,52	9,22 ± 1,19
Knöcherner Anteil Kortikalis (%)	97,79 ± 2,24	96,42 ± 4,19	96,31 ± 3,42	97,79 ± 1,31	98,52 ± 0,52

Gesamtkallus

Tab. 7

	Unbeschichtet	PDLLA	Simvastatin low dose	Simvastatin high dose	BMP-2
Gesamtfläche Kallus (mm²)	14,03 ± 2,94	12,29 ± 6,55	11,70 ± 4,33	12,29 ± 3,34	10,15 ± 3,11
Knöcherne Fläche Gesamtkallus (mm²)	9,65 ± 1,01	8,27 ± 2,71	8,16 ± 2,71	9,60 ± 2,76	7,84 ± 1,95
Knöcherner Anteil Gesamtkallus (%)	70,27 ± 8,61	72,20 ± 11,57	70,28 ± 9,24	78,14 ± 3,77	78,58 ± 5,69
Knorpelfläche Gesamtkallus (mm²)	0,62 ± 0,36	0,27 ± 0,40	0,09 ± 0,07	0,02 ± 0,03*	0,08 ± 0,06*
Knorpelanteil Gesamtkallus (%)	4,78 ± 2,83	1,69 ± 1,73	0,99 ± 0,93	0,15 ± 0,19*	0,74 ± 0,64

*p < 0,05 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Bonferroni- Holm- Korrektur)

Periostaler Kallus

Tab. 8

	Unbeschichtet	PDLLA	Simvastatin low dose	Simvastatin high dose	BMP-2
Gesamtfläche periost. Kallus (mm²)	12,51 ± 3,11	10,22 ± 6,11	10,15 ± 3,78	10,84 ± 2,93	8,91 ± 3,24
Fläche periost. Kallus / Baseline (mm)	4,86 ± 1,29	4,02 ± 2,27	4,08 ± 1,16	4,04 ± 0,95	3,48 ± 1,24
Knöcherne Fläche periost. Kallus (mm²)	8,87 ± 1,12	7,31 ± 2,66	7,42 ± 2,49	8,81 ± 2,68	7,07 ± 1,98
Knöcherner Anteil periost. Kallus (%)	72,89 ± 9,92	77,34 ± 12,28	73,62 ± 8,58	80,92 ± 4,37	81,55 ± 7,27
Knorpelfläche periost. Kallus (mm²)	0,58 ± 0,34	0,26 ± 0,40	0,08 ± 0,07	0,02 ± 0,03*	0,08 ± 0,06*
Knorpelanteil periost.Kallus (%)	4,91 ± 2,83	1,87 ± 1,85	0,97 ± 1,05	0,17 ± 0,22*	0,85 ± 0,76

*p < 0,05 (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Bonferroni- Holm- Korrektur)

Endostaler Kallus

Tab. 9

	Unbeschichtet	PDLLA	Simvastatin low dose	Simvastatin high dose	BMP-2
Gesamtfläche endost. Kallus (mm²)	1,51 ± 0,76	2,06 ± 0,81	1,56 ± 0,73	1,44 ± 0,78	1,24 ± 0,42
Knöchere Fläche endost. Kallus (mm²)	0,78 ± 0,47	0,97 ± 0,32	0,74 ± 0,35	0,79 ± 0,46	0,77 ± 0,30
Knöcherner Anteil endost. Kallus (%)	49,60 ± 13,97	49,94 ± 13,97	48,07 ± 14,40	55,25 ± 10,26	62,35 ± 16,54
Knorpelfläche endost. Kallus (mm²)	0,04 ± 0,08	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Knorpelanteil endost. Kallus(%)	4,45 ± 10,67	0,75 ± 1,80	1,04 ± 2,35	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Der Tibiadurchmesser (Baseline) ist vergleichbar in den einzelnen Untersuchungsgruppen (Tab. 4).

Auch bei der Zusammensetzung der Kortices der einzelnen Gruppen ergeben sich keine größeren Unterschiede, die Gesamtfläche (in mm²) und auch der knöcherne Anteil der Kortices (in %) sind annähernd konstant (Tab. 5).

Jedoch zeigt sich nach 42 Tagen im Gesamtkallus ein höherer knöcherner Anteil bei der Simvastatin-high-dose-Gruppe (im Mittelwert 78,14% bei einer Standardabweichung von $\pm 3,77$) und der BMP-2-Gruppe (78,58% $\pm 5,69$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (70,27% $\pm 8,61$). Darüber hinaus weisen diese beiden Gruppen einen niedrigeren Knorpelanteil im Gesamtkallus auf, der allein bei der Simvastatin-high-dose-Gruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$) niedriger ist (0,15% $\pm 0,19$) als bei der Kontrollgruppe (4,78% $\pm 2,83$) (Tab. 6).

Diese Ergebnisse bestätigen sich bei denen des periostalen Kallus (Tab. 7), der bei der Beurteilung der Frakturheilung bei diesem Versuchsvorhaben eine größere Aussagekraft besitzt, als die Ergebnisse des endostalen Kallus, dessen Größe und Zusammensetzung durch den Nagel im Markraum beeinflusst wird (Tab. 8).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Frakturheilung unter der lokalen Applikation von Simvastatin. Anhand eines standardisierten Frakturmodells an der Rattentibia wird die Heilung in der frühen Phase des Remodellings, 42 Tage nach der Fraktur, beurteilt.

Um einen möglichen Effekt von Simvastatin auf den Knochenheilungsprozess darstellen zu können, wurden biomechanische, histomorphologische, histomorphometrische und radiologische Untersuchungen durchgeführt.

Dabei lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass Simvastatin dosisabhängig die Frakturheilung unter der lokalen Applikation stimuliert und beschleunigt.

4.1 Radiologie

Die radiologischen Ergebnisse, d.h. die Auswertung der Überbrückung der Kortices in zwei Ebenen nach 42 Tagen, zeigen eine beschleunigte Frakturheilung durch die Stimulation mit Simvastatin und BMP-2.

Im zeitlichen Verlauf ist sowohl nach 28 Tagen als auch nach 42 Tagen eine verstärkte knöcherne Überbrückung der Kortices durch die lokale Simvastatingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe auszumachen. Dabei zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt zwischen den beiden Simvastatinkonzentrationen, denn der beobachtete Effekt ist bei der Simvastatingruppe mit der höheren Dosierung im Vergleich zur niedrigeren Dosierung zu beiden Zeitpunkten verstärkt zu erkennen, wobei ein größerer Unterschied nach 28 Tagen besteht.

Sowohl nach 28 als auch nach 42 Tagen gibt es bei der Kontrollgruppe kein Tier, das eine vollständige Konsolidierung anhand der Röntgenbilder aufweist. Im Gegensatz dazu sind in der Gruppe IV und V nach 42 Tagen mehr als 50% der Tibiae radiologisch vollständig überbrückt, was deutlich auf einen beschleunigten Effekt durch Simvastatin bzw. BMP-2 hinweist.

Die Beurteilung der Frakturheilung anhand der Überbrückung der Kortices unter radiologischen Gesichtspunkten stellt ein subjektives Verfahren dar. Deshalb erfolgte für die vorliegende Arbeit die Auswertung der Röntgenbilder durch drei voneinander unabhängige Personen.

Diese Möglichkeit zur Beurteilung des Heilungsprozesses ist unspezifischer als die biomechanische oder die histomorphometrische Auswertung, stellt aber die einzige dar, die im klinischen Alltag angewendet werden kann, da biomechanische und histologische Untersuchungen in der Praxis nicht möglich sind.

Aufgrund der klinischen Relevanz erscheint es daher sinnvoll, radiologische Ergebnisse zusätzlich zu erheben und diese dann mit den biomechanischen und histomorphometrischen zu vergleichen.

Daher wurden die Ergebnisse der radiologischen Untersuchung ausschließlich deskriptiv und nicht statistisch ausgewertet.

4.2 Biomechanik

Die Heilungsbeschleunigung durch Simvastatin lässt sich auch an den biomechanischen Ergebnissen nach 42 Tagen zeigen, die ein signifikant höheres maximales Drehmoment und torsionale Steifigkeit der Simvastatin-high-dose-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Diese erhöhte biomechanische Stabilität des Knochens weist auf eine beschleunigte Mineralisation des Knorpelkallus und somit auf ein weiter fortgeschrittenes Kallusremodelling bei der Simvastatingruppe hin.

Bei der niedrigeren Simvastatindosierung (3 µg) ist dieser Effekt biomechanisch nicht so deutlich zu erkennen, was erneut darauf hindeutet, dass die Wirkung von Simvastatin auf den Knochen dosisabhängig zu sein scheint.

Bei der Positivkontrollgruppe (BMP-2) ist lediglich bei der torsionalen Steifigkeit ein signifikant höheres Ergebnis im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen, das bereits in früheren Versuchen gezeigt wurde ¹².

4.3 Histomorphologie und Histomorphometrie

Auch die histomorphometrischen Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass Simvastatin dosisabhängig stimulierende Effekte auf die Knochenheilung aufweist.

Die mit hoher Simvastatindosis behandelte Gruppe zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Anteil von Knorpel im Gesamtkallus.

Diese signifikante Abnahme der Knorpelanteile v.a. im periostalen Kallus und die höhere Mineralisation des Kallus in der Simvastatin-high-dose-Gruppe nach 42 Tagen lassen darauf schließen, dass der Knorpelkallus durch die enchondrale Ossifikation der

sekundären Frakturheilung einem beschleunigten Umbauprozess zum festeren Geflechtknochen unterworfen ist, was auch histomorphologisch zu erkennen ist.

Bei der BMP-2-Gruppe zeigen sich vergleichend zu früheren Versuchen auch histomorphometrisch positive Effekte auf die Frakturheilung¹². Die Stimulation des Kallusremodelling zeigt sich sowohl anhand der Mineralisation als auch anhand des Knorpelanteils im Kallus.

Histomorphologisch zeigen die Präparate aller Gruppen eine regelrechte Kalluszusammensetzung mit knorpeligen und mineralisierten Anteilen. Bei der Kallusgröße sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen, jedoch ist die Kallusgröße bei den Simvastatingruppen und der BMP-2-Gruppe geringer, was auf einen früheren Umbau des Kallus im Vergleich zur Kontrollgruppe hinweist.

Es sind darüber hinaus keine Osteolysen oder Zeichen für eine Infektion zu erkennen.

4.4 Vergleich mit den Ergebnissen nach 28 Tagen

Im Vergleich der bereits beschriebenen Ergebnisse nach 42 Tagen mit denen nach 28 Tagen, die Hauptbestandteil der Dissertationsarbeit von Frau Franziska Luttosch sind, fallen die Ergebnisse sowohl biomechanisch als auch histomorphomerisch ähnlich aus. Zum früheren Zeitpunkt nach 28 Tagen zeigt sich bei den biomechanischen Ergebnissen sowohl für das maximale Drehmoment als auch für die torsionale Steifigkeit ein positiver Effekt durch das Simvastatin in hoher Dosierung im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe, das maximale Drehmoment ist sogar signifikant höher bei der Simvastatingruppe.

Auch histomorphometrisch ist v.a. anhand des geringeren Knorpelanteils in Gruppe IV (4,09%) die positive Wirkung des Simvastatins im Vergleich zur Kontrollgruppe (6,41%) zu erkennen.

Diese Ergebnisse nach 28 Tagen, wo sich der Heilungsprozess in der Phase der enchondralen Ossifikation befindet, verdeutlichen, dass bereits zu diesem Zeitpunkt eine Stimulation durch Simvastatin stattfindet.

4.5 Vergleich mit anderen Studien

Nach der entscheidenden Entdeckung von Mundy, der als erster 1999 den Zusammenhang der Statine und dem Knochenmetabolismus beschrieb, indem Statine über die Stimulation des osteoinduktiven Wachstumsfaktor BMP-2 wirken ³², folgten zahlreiche Studien mit dem Ziel, das Potential der Statine, anabol auf den Knochen wirken zu können, näher zu untersuchen.

Die Auswirkungen der Statine auf den Knochenstoffwechsel wurden seitdem in experimentellen (in vitro und in vivo) ^{47,54,62,63,64,65,66,67,68} und auch in klinischen Studien ^{69,70,71} mehrfach untersucht, wobei nicht alle Studien einen stimulierenden Effekt zeigen konnten.

In den klinischen Studien zu Statinen und deren Effekte auf den Knochen wurden verschiedene Aspekte näher untersucht, wobei der Zusammenhang zwischen dem Risiko für das Auftreten einer Fraktur und der Statineinnahme ein viel diskutiertes Thema darstellt.

Die ersten fallkontrollierten Studien dazu führten Wang et al. (2000) ⁷² und Meier et al. (2000) ⁷³ durch, die beide unabhängig voneinander ein reduziertes Frakturrisiko unter der Statineinnahme beschrieben.

Im Gegensatz dazu konnten andere Studien diesen Zusammenhang nicht zeigen ^{74,75,76,77}.

Auch in aktuellen Studien zu dieses Thema gibt es kontroverse Ergebnisse: In einer Meta-Analyse stellte Nguyen (2007) dar, dass die Statineinnahme das Risiko einer Hüftkopffraktur um 27% bis 58% senken kann ⁷⁸, Toh (2007) hingegen konnte das nicht bestätigen; er konnte keine eindeutige Korrelation zwischen der Statineinnahme und einer Reduktion des Frakturrisikos zeigen ⁷⁹.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, den klinischen Studien v.a. mit dem Ziel einer verbesserten Osteoporosebehandlung näher untersuchten, ist der Zusammenhang zwischen der Statineinnahme und der Knochendichte (Bone mineral density [BMD]), ein wichtiger Parameter für das Frakturrisiko und ein Kriterium für die Beurteilung von Medikamenten, die auf den Knochen wirken.

Die Ergebnisse dazu zeigten sich erneut uneinheitlich, teilweise wurden positive ^{80,81,82} und teilweise negative Ergebnisse ^{75,83,84,85} in Bezug auf die BMD dargestellt.

Erklärungen zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen sind vielfältig. Ein möglicher Ansatzpunkt stellt das unterschiedliche Design zwischen den einzelnen Studien dar. Der protektive Effekt der Statine auf das Frakturrisiko wurde fast ausschließlich in Beobachtungsstudien beschrieben.

Bis jetzt gibt es jedoch keine prospektiven randomisiert kontrollierten Studien, die genau diesen Zusammenhang des Frakturrisikos unter der Statineinnahme untersuchten.

Auch eine Heterogenität bezüglich der Studienpopulation, des Alters, des Geschlechts, des Gewichts, der Dosis, der Dauer der Einnahme, des verwendeten Statins (Simvastatin, Lovastatin, Pravastatin) und der Lokalisation der Fraktur könnten die unterschiedlichen Resultate der Studien erklären.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte das Phänomen des „healthy drug user“-Effekts sein ⁷⁹. Damit sind die Patienten bzw. Untersuchungspersonen gemeint, die präventiv Interventionen, in diesem Fall Statine, erhielten und aufgrund dieser Einnahme bestimmte Verhaltensweisen zeigen, die für ein geringeres Frakturrisiko sorgen, z.B. durch eine risikoärmere Lebensweise oder ein gesundheitsbewussteres Leben.

Gegen diese Hypothese spricht aber wiederum, dass andere lipidsenkende Medikamente keine Wirkungen auf das Frakturrisiko zeigen und somit dieser Effekt Statin-spezifisch zu sein scheint.

Ein anderer Ansatz, der die negativen Ergebnisse der klinischen Studien erklären könnte, ist der hohe Abbau der Statine in der Leber, der bei der oralen Applikation auftritt. Die Folge ist eine geringe systemische Konzentration und somit eine reduzierte Dosis und damit geringere Wirkung auf den Knochen.

Alle Statine sind bei der oralen Aufnahme einem hohen First-pass-Effekt in der Leber unterworfen, weswegen lediglich 5% der verabreichten Dosis den systemischen Blutkreislauf erreichen ^{86,87}. Nur diesem geringen Anteil ist es dann überhaupt möglich, an den Knochen zu gelangen und dort anabole Effekte erzielen zu können.

Diese hohe Leberspezifität der Statine ist für den cholesterinsenkenden Effekt von Vorteil, wäre jedoch für eine Anwendung zur Stimulation der Knochenneubildung nachteilig.

Daher werden für diese Anwendung weitere Applikationsmöglichkeiten neben der oralen untersucht. Verschiedene Studien konnten einen förderlichen Effekt auf die reine Knochenneubildung (nicht Fraktur- oder Osteotomieheilung) zeigen.

Gutierrez (2006) umging den First-pass-Effekt der Statine durch die transdermale Applikation von Lovastatin. Durch diese Applikation war in einem Rattenversuch eine

höhere Statinkonzentration im Blut und somit eine Steigerung des Knochenwachstums um 150% nachweisbar ⁵⁶.

Die lokale Applikation direkt am Knochen ist eine weitere Applikationsmöglichkeit, die mehrfach untersucht wurde, um den Abbauprozess in der Leber zu umgehen und so eine effektivere Stimulation des Knochens zu erreichen.

Durch die subkutane Injektionen von Lovastatin und Simvastatin direkt über der Schädelkalotte von Mäusen kam es zu einer 50%igen Zunahme an neuer Knochensubstanz ³². Wong (2005) gelang dies durch eine Kollagenmatrix, in die Simvastatin eingearbeitet wurde, um die lokale Stimulation am Knochen zu zeigen ⁵⁷.

Zusammenfassend lässt sich bei der Beurteilung der bisherigen klinischen Studien sagen, dass unter der oralen Einnahme von Statinen in einer lipidsenkenden Dosis keine befriedigenden anabolen Wirkungen auf den Knochen zu erzielen sind, die lokale Applikation jedoch viel versprechend ist.

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung der Statine auf die **Frakturheilung** untersucht werden.

Skoglund (2002) war der erste, der die stimulierenden Wirkungen der Statine auf den Knochenheilungsprozess bei einer manuell gesetzten Fraktur in einem Tiermodell beschrieb ⁵⁵. Die orale Applikation von Simvastatin führte zu einer Beschleunigung der Frakturheilung in einem Mäuseversuch. Die dabei verabreichte Dosis von Simvastatin war jedoch sehr hoch (120 mg/kg Körpergewicht pro Tag); sie war im Vergleich viel höher als die Dosis, die (klinisch) bei Menschen verwendet wird, um den Cholesterinspiegel zu senken (20-40 mg pro Tag). Bei dieser hohen Dosis, von der aufgrund des bereits beschriebenen First-pass-Effektes der Leber nur ein geringer Anteil den Knochen erreicht, ist das Risiko für das Auftreten von pathogenen bzw. unerwünschten Wirkungen wie Leberversagen, Rhabdomyolyse und Nierenschäden deutlich erhöht.

4.6 Applikationsmöglichkeiten

Um das Risiko von Nebenwirkungen zu vermeiden wurde auch unter dem Gesichtspunkt der Stimulation der Frakturheilung die lokale Applikation von Statinen untersucht.

Skoglund (2007) applizierte in einem weiteren Versuch die Statine kontinuierlich über lokal an den Frakturbereich eingebrachte Mini-Pumpen und erzielte damit eine Zunahme der Knochenfestigkeit um 170%, wobei er eine deutlich niedrigere Dosis verwendete (0,1 mg Simvastatin/kg Körpergewicht pro Tag)⁵⁹ als in seinem Vorversuch von 2002⁵⁵.

Wang (2007) verabreichte Simvastatin subkutan über einer Tibiafraktur bei Ratten und zeigte biomechanisch und histomorphometrisch eine Stimulation der Heilung⁸⁸.

Eine weitere Möglichkeit der lokalen Applikation von Statinen stellen Carriersysteme dar, z.B. Nanobeats, wie sie Garrett (2007) verwendete, um so Lovastatin direkt an die Fraktur zu bringen⁵⁸. Damit konnte auch er eine Stimulation der Frakturheilung zeigen.

Nyan (2007) verwendete Calciumsulfat als Carrier für Simvastatin⁸⁹, Thylin (2007) ein Methylzellulosegel⁹⁰, mit denen beide eine Knochenstimulation erreichten, jedoch trat bei beiden eine Entzündungsreaktion auf.

Ein anderes Applikationsverfahren untersuchte Gutierrez (2008), der durch die transdermale Verabreichung eine verbesserte Frakturheilung in einem Tierversuch beschrieb⁹¹. Mit dieser Methode erreicht eine hohe Konzentration an Statinen den systemischen Kreislauf, da der Abbau der Leber umgangen wird und somit über den Blutkreislauf ausreichend der Frakturheilung zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die lokale Applikation von Simvastatin durch die kontinuierliche Freisetzung von PDLLA-beschichteten Marknägeln, die als Carrier für Simvastatin dienten und gleichzeitig die Tibiafraktur stabilisierten.

Mit dieser in der Arbeitsgruppe entwickelten PDLLA-Beschichtung war es möglich, den eingearbeiteten Wirkstoff nach einem initialen Peak kontinuierlich in biologisch aktiver Form freizusetzen, ohne dabei eine Entzündungsreaktion oder andere Nebenwirkungen hervorzurufen⁶⁰.

Der zweite große Vorteil ist die hohe mechanische Stabilität der Beschichtung, die einer intramedullären Insertion zu ca. 96% standhält⁶⁰.

Die Versuchstiere der Gruppe II (PDLLA-Gruppe) erhielten ihre Stabilisierung mit ausschließlich PDLLA-beschichteten Marknägeln, ohne darin eingearbeitete

Wirksubstanz. Sowohl die biomechanischen als auch die histomorphometrischen Ergebnisse dieser Gruppe zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der keine Beschichtung verwendet wurde, eine erhöhte Stabilität (höheres maximales Drehmoment und torsionale Steifigkeit) bzw. ein beschleunigtes Kallusremodelling (erhöhter knöcherner Anteil und niedrigerer Knorpelanteil im periostalen Kallus). Auch diese Ergebnisse sind ähnlich mit denen aus einem früheren Versuch der eigenen Arbeitsgruppe¹³.

Als Fazit lässt sich sagen, dass die bisherigen Studien, die die Statine lokal anwendeten, in den meisten Fällen einen positiven Effekt bei der Frakturheilung nachwiesen.

Gerade bei Frakturen der langen Röhrenknochen stellt die Verwendung von PDLLA-beschichteten Trägermaterialien, die zur intramedullären Stabilisierung verwendet werden, eine ideale Möglichkeit der lokalen Applikation dar. Das beschichtete Osteosynthesematerial dient somit zum einen der Stabilisierung der Fraktur und gleichzeitig als Carrier für den Wachstumsfaktor bzw. Simvastatin. Damit sind für die lokale Applikation des Untersuchungstoffes keine zusätzlichen Fremdkörper notwendig und die Fraktur muss nicht eröffnet werden.

4.7 Verwendete Dosierungen

In dem vorliegenden Versuchsvorhaben wurden zwei unterschiedlichen Dosierungen von Simvastatin gewählt. Dabei wurde die hohe Dosierung (50 µg) wie in einem Vorversuch der eigenen Arbeitsgruppe gewählt, in der mit 50 µg BMP-2 in einem ähnlichen Versuchsaufbau eine Stimulation der Frakturheilung gezeigt werden konnte¹².

In Anlehnung daran wurde dann auch die BMP-2-Dosis (50 µg) in dem vorliegenden Versuch (Positivkontrollgruppe) gewählt, denn unter dieser Dosierung zeigte sich eine beschleunigte Frakturheilung ohne Anzeichen von systemischen und lokalen Nebenwirkungen, Knochenwucherungen oder eine Kallushypertrophie.

Um die dosisabhängige Wirkung des Simvastatins auf die Frakturheilung zeigen zu können, wurde die zweite Dosis vergleichsweise niedrig gewählt (3 µg).

In anderen vergleichbaren Versuchen, die bereits beschrieben wurden, wurden folgende Dosierungen in einem Frakturmodell verwendet:

- 0,1 mg Simvastatin/kg Körpergewicht pro Tag über eine Mini-Pumpe bzw. 5-10 mg/kg Körpergewicht pro Tag kontinuierlich subkutan (Skoglund 2007) ⁵⁹
- 10 mg/kg/Tag subkutan über der Fraktur (Wang 2007) ⁸⁸
- 0,1-5 mg/kg/Tag transdermal für 5 Tage (Gutierrez 2008) ⁹¹

Mit der vorliegenden Applikationsmöglichkeit über den PDLLA-beschichteten Marknagel konnte im Vergleich dazu mit einer geringeren Dosis die Stimulation der Frakturheilung erreicht werden. Aus der PDLLA-Beschichtung wurden bei Gruppe IV insgesamt 0,2 mg Simvastatin/kg KG kontinuierlich freigesetzt. Der Erfolg auf die beschleunigte Frakturheilung mit dieser geringen Dosis ist lediglich mit der der Mini-Pumpe zu vergleichen, deren Verwendung jedoch wesentlich aufwendiger ist als ein beschichtetes Implantat, was für die Effektivität dieser Applikationsmethode spricht.

4.8 Zusammenhang zwischen Statinen und BMP-2

Bis heute ist der entscheidende Mechanismus, wie Statine den Knochenmetabolismus positiv beeinflussen, nicht eindeutig geklärt.

Es wird angenommen, dass Statine primär durch die Stimulation der Osteoblasten den anabolen Knocheneffekt bewirken, und zwar über den lokalen Wachstumsfaktor BMP-2. Bereits Mundy wies 1999 eine vermehrte Expression der BMP-2-mRNA durch Simvastatin in einer Northern-Blot-Analyse in menschlichen Knochenzellen nach ³².

Maeda (2001,2004) zeigte in einer In-vitro-Studie anhand von einer osteoblastären Zelllinie (MC3T3-E1), dass Statine die Osteoblastendifferenzierung fördern und die Mineralisation beschleunigen ^{63,92}.

Es wird daher angenommen, dass es durch die stimulierte BMP-2-Synthese zu einer vermehrten Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten kommt, die für den anabolen Effekt beim Knochenwachstum verantwortlich sind.

Der genaue Wirkungsmechanismus der Statine auf die BMP-2-Expression wird in den meisten Studien über den Mevalonat-Pathway beschrieben. Dieser Mevalonat-Pathway beschreibt die Synthese des Cholesterins aus Acetyl-CoA im menschlichen Körper, der v.a. in der Leber stattfindet. Durch Hemmung des Schrittmacherenzym dieses

Reaktionsweges, der HMG-CoA-Reduktase, ist der cholesterinsenkende Effekt der Statine zu erklären. Das Resultat ist ein geringerer Gesamtcholesterinspiegel im Blut und v.a. eine geringere Konzentration vom LDL-Cholesterin, das hauptverantwortlich für das Auftreten der generalisierten Gefäßsklerose ist und weswegen die Statine heute die Medikamente der Wahl bei Hypercholesterinämie darstellen.

Auch der Effekt auf den Knochen wird über diesen Mevalonatweg beschrieben, der zunächst genauso wie der der Cholesterinsynthese über das Zwischenprodukt Mevalonat abläuft, sich aber dann von diesem unterscheidet.

Über die Hemmung von Isoprenoid-Zwischenprodukten wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) werden wichtige Zellsignalmoleküle unterdrückt. Diese Isoprenoide spielen in der posttranslationalen Modifikation (Prenylation) von verschiedenen Proteinen eine wichtige Rolle, die bei vielen Zellfunktionen wichtig sind, wie die Small-GTP-bindenden Proteine (Ras, Rho und Rac), welche u.a. bei der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung mitwirken.

Durch diese Blockade im Mevalonatweg bzw. durch die Hemmung der Prenylation und damit die Unterdrückung der Funktion der GTP-bindenden Proteine wird eine erhöhte BMP-2-Expression angenommen und somit die Förderung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten; der exakte Mechanismus ist aber weiterhin nicht eindeutig geklärt.

Was sind eigentlich die besonderen Vorteile der Statine gegenüber dem BMP-2, von dem bisher in zahlreichen Studien der positive Effekt auf das Knochenwachstum nachgewiesen wurde und das bereits klinisch in diesem Zusammenhang eingesetzt wird? Welche Vorteile haben Statine gegenüber rhBMP-2, dessen Expression ja durch die Statine gefördert wird?

Aufgrund der langjährigen Erfahrung mit Statinen zur Cholesterinsenkung sind diese bereits sehr gut untersucht; die Nebenwirkungen und Langzeitwirkungen sind bekannt und die Statine sind für die Cholesterinsenkung weltweit zugelassen.

Im Gegensatz dazu steht das rhBMP-2 noch am Anfang seiner klinischen Verwendung, das bisher nur in der Wirbelsäulenchirurgie und bei offenen Tibiafrakturen von Medtronic („Infuse ®“) eingesetzt wird. Darüber hinaus wurde bei der Verwendung von rhBMP-2 das Auftreten von ektopen Ossifikationen in anderem Gewebe, wie in

angrenzendem Muskelgewebe beschrieben ⁹³, welches z.B. bei einem nicht korrekt platzierten Carrier zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann.

Außerdem sind Statine sehr viel kostengünstiger als das rhBMP-2. Eine Behandlung mit Simvastatin kostet ca. 200 € pro Tag (und bei lokaler Applikation vom Marknagel wäre nur eine einmale Gabe nötig), im Vergleich dazu eine Behandlung mit BMP-2 ca. 3200 € pro Tag.

4.9 Aussichten

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Ergebnisse feststellen, dass Statine einen stimulierenden Einfluss auf die Frakturheilung haben, wenn sie lokal durch einen beschichteten Marknagel kontinuierlich freigesetzt werden.

Statine sind daher ein idealer Kandidat für anabole Knochenstimulatoren, die gerade für die Frakturheilung in der traumatologischen und orthopädischen Chirurgie gut geeignet sind.

Neben einer Verbesserung und Weiterentwicklung von Implantatsystemen wird zukünftig die Verwendung von stimulierenden Faktoren in der Knochenbruchheilung einen immer größeren Stellenwert einnehmen.

Durch den positiven Effekt auf die BMP-2-Expression bieten Statine in diesem Zusammenhang eine Menge potentielle Vorteile mit sich, die für einen klinischen Einsatz zur Frakturstimulation sprechen. Wie bereits beschrieben sind sie aufgrund der cholesterinsenkenden Wirkung in der Klinik gut bewährt, weltweit zugelassen und deutlich kostengünstiger als andere Wachstumsfaktoren, wie z.B. rhBMP-2.

Für eine klinische Zulassung der Statine für die Frakturheilung sind jedoch weitere Studien notwendig. Zusätzliche Erkenntnisse müssen noch in prospektiven klinischen Studien gewonnen werden.

Ein weiterer Fortschritt wären knochenspezifische Statine, die nicht primär auf die Leber wirken, sondern direkt an den Osteoblasten, mit denen eine weitere Dosisreduktion erreicht werden könnte.

Auch die Kombination der Statine mit anderen Wachstumsfaktoren könnte die Frakturheilung weiter beschleunigen.

5. Zusammenfassung

Bis heute ist die gestörte bzw. verzögerte Heilung von Knochenbrüchen ein großes Problem in der operativen Traumatologie und Orthopädie.

Deshalb spielt der Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Frakturbehandlung eine immer größere Rolle. Wichtiger Vertreter dieser Gruppe sind die Bone morphogenic proteins (BMPs), von denen das BMP-2 und BMP-7 bereits erfolgreich klinisch genutzt werden. Vor allem das bisher häufig untersuchte BMP-2 ist durch sein osteo- und chondroinduktives Potential ein wichtiger Vertreter in der Stimulation der Frakturheilung.

1999 identifizierte G. Mundy Simvastatin, ein HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, unter 30000 Substanzen als Trigger für die BMP-2-Expression. Statine, wozu Simvastatin gehört, wurden bisher ausschließlich zur Senkung des Cholesterinspiegels verwendet und mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sie darüber hinaus einen stimulierenden Effekt auf den Knochenmetabolismus aufweisen und somit auf dem Gebiet der Stimulation der Knochenheilung die Möglichkeit eines weiteren Indikationsfeldes bieten.

Aufgrund dieser Entdeckung folgten bis heute verschiedene klinische und experimentelle Studien zu diesem Thema; viele konnten den anabolen Effekt der Statine zeigen, andere jedoch nicht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt der lokalen Applikation von Simvastatin auf die Frakturheilung in einem Rattenmodell zu untersuchen. Mit Hilfe eines Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) beschichteten intramedullären Implantates war es zum einen möglich, Simvastatin lokal und kontrolliert am Frakturspalt freizusetzen und zum anderen die Fraktur zu stabilisieren.

Als Versuchstiere wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet, denen eine standardisierte Fraktur der rechten Tibia zugefügt wurde und diese anschließend mit einem Simvastatin-beschichteten Marknagel versorgt wurde, wobei zwei verschiedenen Dosierungen untersucht wurden (3 µg und 50 µg). Der Heilungsverlauf wurde anschließend zwischen mit dem der Kontrollgruppe (unbeschichtetes Implantate) und dem durch den osteoinduktiven Wachstumsfaktor BMP-2 beschleunigten Verlauf verglichen.

Anhand radiologischer, biomechanischer und histomorphometrischer Untersuchungen konnte nach 28 und 42 Tagen ein dosisabhängiger positiver Effekt von Simvastatin auf

die Frakturheilung nachgewiesen werden, wobei in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Ergebnisse nach 42 Tagen beschrieben werden. Sowohl biomechanisch als auch histomorphometrisch ergaben sich nach 42 Tagen signifikante Unterschiede zur unbeschichteten Kontrollgruppe.

Biomechanisch zeigte sich bei der Simvastatingruppe mit der höheren Dosierung (50 µg) sowohl beim maximalen Drehmoment als auch bei der torsionalen Steifigkeit ein signifikant ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis/Mann-Whitney, Bonferroni-Holm) höheres Ergebnis im Vergleich zur Kontrollgruppe, histomorphometrisch erreichte diese Gruppe einen signifikant niedrigeren Knorpelanteil im Gesamtkallus im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Simvastatin dosisabhängig einen stimulierenden Effekt auf die Knochenbruchheilung hat und dass sich somit klinisch viele Vorteile aus der Verwendung dieser Substanz ergeben können, v.a. in Kombination mit einem PDLLA-beschichteten Implantat.

Neben der langjährigen klinischen Erfahrung mit dieser Medikamentengruppe und dem damit sehr gut bekannten Nebenwirkungspotential, sprechen v.a. die geringeren Kosten, z.B. im Vergleich zu anderen knochenanabolen Substanzen wie rhBMP-2, für die Verwendung der Statine im Zusammenhang mit der Knochenstimulation bzw. der Frakturheilung.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Einhorn TA, Lane JM. Significant advances have been made in the way surgeons treat fractures [editorial]. *Clin Orthop* 1998;2-3.
- 2 Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg* 2000;43(4):256-62.
- 3 McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg* 1978;60-B(2):150-162.
- 4 Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355:7-21.
- 5 Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-15.
- 6 Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 1989;248:283-93.
- 7 Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury Int J Care Injured* 2005;36:1392-1404.
- 8 Frost HM. Bone dynamics in metabolic bone disease. *J Bone Joint Surg Am* 1966;48(6):1192-203.
- 9 Einhorn TA. Current concepts review. Enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:940-956.
- 10 Runkel M, Rommes PM. Pseudarthrosen. *Unfallchirurg* 2000;103:51-63.
- 11 Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995;10:1272-81.
- 12 Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. BMP-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment. *Bone* 2002;6:618-22.
- 13 Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001;28:341-350.
- 14 Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T, et al. Synergistic effect of IGF-I and TGF-1 on fracture healing in rats - Single versus combined application of IGF-I and TGF- β 1. *Acta Orthop.Scand* 2003;74:604-10.
- 15 Schmidmaier G, Wildemann B, Lucke M, et al. Insulin like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) have synergistic effects on fracture healing in rats. *Trans Orthop Res Soc* 2001;47:102.
- 16 Schmidmaier G, Wildemann B, Lübberstedt M, Haas NP, Raschke M. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res Applied Biomat* 2003;65b:157- 62.

- 17 Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, et al. Long term effects of local growth factor (IGF-I AND TGF-1) treatment on fracture healing - A safety study for using growth factors-. *J Orthop Res* 2004;22(3):514-9.
- 18 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
- 19 Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
- 20 Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1828-32.
- 21 Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22:591-603.
- 22 Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87(6):2220-4.
- 23 Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(8):1425-35.
- 24 Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513-20.
- 25 Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002;143:1545-53.
- 26 Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:2123-34.
- 27 Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1990;322:802-9.
- 28 Lane N, Sanchez S, Modin G, Genant H, Pierini E, Arnaud C. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. *J Clin Invest* 1998;102:1627-33.
- 29 Hodsmann AB, Fraher LJ. Biochemical responses to sequential human parathyroid hormone (1-38) and calcitonin in osteoporotic patients. *Bone Miner* 1990;9:137-52.
- 30 Lindsay R, Nieves J, Formica C, et al. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet* 1997;350:550-5.
- 31 Barbehenn EK, Lurie P, Wolfe SM. Osteosarcoma risk in rats using PTH 1-34. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:383.
- 32 Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-9.

- 33 Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1971;74:1-12.
- 34 Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236 A, ML-236B, and ML- 236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Japan)* 1976;29:1346–8.
- 35 Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1980;35:259-66.
- 36 Brown G, Albers JJ, Fisher LD, et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990;323:1289-98.
- 37 Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344: 1383–9.
- 38 Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335:1001–9.
- 39 Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:1349-57.
- 40 MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7–22.
- 41 Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301–7.
- 42 Rychlik R, Nordt TK, Nelles S. Statins-Innovative Drugs versus Generic Drugs. A systematic literature search on Atorvastatin and Simvastatin. *Gesundh ökon Qual mang* 2003;8:307-313.
- 43 Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.) *Arzneiverordnungs-Report 2007*, Heidelberg: Springer-Verlag 2008;9:985.
- 44 Brown MS, Goldstein JL. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Research* 1980;21:507–17.
- 45 Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. Review article. *Oral Dis* 2006;12:85-101.
- 46 LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999;282:2340–6.
- 47 Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:688–92.
- 48 Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230-5.

- 49 Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation* 1995;92:3172-7.
- 50 Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-10.
- 51 Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering – are they clinically relevant? *Eur Heart J* 2003;24:225-48.
- 52 Fassbender K, Simons M, Bergmann C, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -Amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5856-61.
- 53 Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6:1399-402.
- 54 Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1636–41.
- 55 Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:2004-8.
- 56 Gutierrez G, Lalka D, Garrett I, Rossini G, Mundy G. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporos Int* 2006;17:1033-42.
- 57 Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofacial Surg* 2003;41:244-8.
- 58 Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, et al. Locally Delivered Lovastatin Nanoparticles Enhance Fracture Healing in Rats. *J Orthop Res* 2007;25(10):1351-7.
- 59 Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskelet Disord* 2007;27;8:98.
- 60 Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res, Applied Biomat* 2001;58(4):449-55.
- 61 Schmidmaier et al EJT 2004. PDF siehe homepage.
- 62 Garrett IR, Gutierrez G, Mundy GR. Statins and bone formation. *Curr Pharm Design* 2001;7:715-36.
- 63 Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:874–7.
- 64 Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, et al. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:478-84.
- 65 Oxlund H, Dalstra M, Andreassen TT. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. *Calcif Tissue Int* 2001;69:299–304.

- 66 Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone* 2004;34:609–18.
- 67 Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:346–50.
- 68 Von Stechow D, Fish S, Yahalom D, et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskelet Disord* 2003;4:8.
- 69 Bauer DC. HMG-CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int* 2003;14:273–82.
- 70 Bauer DC, Mundy GR, Jamal SA, et al. Use of statins and fracture. Results of 4 prospective studies and cumulative meta-analysis of observational studies and controlled trials. *Arch Intern Med* 2004;164:146–52.
- 71 Gonyeau MJ. Statins and osteoporosis: a clinical review. *Pharmacotherapy* 2005;25:228–43.
- 72 Wang PS, Solomon DH, Mogun H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211–6.
- 73 Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA* 2000;283:3205–10.
- 74 Van Staa TP, Wegman S, De Vries F, et al. Use of statins and risk of fractures. *JAMA* 2001;285:1850–5.
- 75 LaCroix AZ, Cauley JA, Pettinger M, et al. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med* 2003;139:97–104.
- 76 Pedersen TR, Kjekshus J. Statin drugs and the risk of fracture: 4S Study group. *JAMA* 2000;284:1921–2.
- 77 Reid IR, Hague W, Emberson J, et al. Effect of pravastatin on frequency of fracture in the LIPID study: secondary analysis of a randomized controlled trial. Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease. *Lancet* 2001;357:509–12.
- 78 Nguyen ND, Wang CY, Eisman JA, Nguyen TV. On the association between statin and fracture: A Bayesian consideration. *Bone* 2007;40:813-20.
- 79 Toh S, Hernández-Díaz S. Statins and fracture risk. A systematic review. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007;6:627-40.
- 80 Edwards CJ, Hart DJ, Spector TD. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. *Lancet* 2000;355:2218–9.
- 81 Cauley JA, Jackson R, Pettinger M, et al. Statin use and bone mineral density (BMD) in older women: the Women's Health Initiative Observational Study (WHI-OS). *J. Bone Miner. Res.* 2000;15 (Supl.):1068.
- 82 Montagnani A, Gonnelli S, Cepollaro C, et al. Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: a 1-year longitudinal study. *Bone* 2003;32:427–33.
- 83 Pasco JA, Kotowicz MA, Henry MJ, Sanders KM, Nicholson GC. Statin use, bone mineral density and fracture risk: Geelong Osteoporosis Study. *Arch Intern Med* 2002;162:537–40.

- 84 Schoofs MW, Sturkenboom MC, van der Klift M, Hofmann A, Pols HA, Stricker BH. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of vertebral fracture. *J Bone Miner Res* 2004;19:1525–30.
- 85 Rejnmark L, Olsen ML, Johnsen SP, Vestergaard P, Sorensen HT, Mosekilde L. Hip fracture risk in statin users-a population-based Danish case-control study. *Osteoporos Int* 2004;15:452–8.
- 86 Blum CB. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Am J Cardiol* 1994;73:3D–11D.
- 87 Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:26-37.
- 88 Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 2007;18(12):1641-50.
- 89 Nyan M, Sato D, Oda M, et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci* 2007;104:384-6.
- 90 Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, et al. Effects of statin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol* 2002;73:1141–8.
- 91 Gutierrez GE, Edwards JR, Garrett IR, et al. Transdermal lovastatin enhances fracture repair in rats. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1722-30.
- 92 Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res*. 1992;33(11):1569-82.
- 93 Sorensen T S, Sorensen AI, Merser S. Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand* 1990;61:353-6.
- 94 Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006;12:6222s-30s.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese Klassifikation
Art.Nr.	Artikelnummer
BMD	Bone mineral density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
bzw.	beziehungsweise
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
IGF	Insulin-like Growth Factor
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low density lipoprotein
MCS	Mesenchymale Stammzelle
p.a.	posterior-anterior
PDGF	Platelet derived growth factor
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
post-Op.	postoperativ
rhBMP-2	rekombinat humanes Bone morphogenetic protein 2
ROI	Region Of Interest
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
VEGF	Vascular Endothelia Growth Factor
vgl.	vergleiche
WF	Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Effekte der Statine auf den Cholesterinmetabolismus. Statine hemmen das Schrittmacherenzym der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Reduktase) und verringern so die Mevalonatkonzentration. Zusätzlich wird die Anzahl der LDL-Rezeptoren erhöht und die Sekretion der Lipoproteine vermindert. In den Hepatozyten wird die Aufnahme des LDL-Cholesterins erhöht, mit der Konsequenz eines geringeren Cholesterinspiegels im Blut.	Seite 18
Abb. 2	Weitere Effekte der Statine über eine Hemmung der Bildung von Isoprenoid-Zwischenprodukten wie FPP und GGPP.	20
Abb. 3	Hautschnitt auf Höhe des rechten Tibiakopfes.	28
Abb. 4	Vorbohren des Markraums.	29
Abb. 5	Kontrollaufnahme mit Bildwandler.	29
Abb. 6	Frakturmaschine zur Erzeugung einer standardisierten Fraktur.	30
Abb. 7	Anfertigung eines postop. Röntgenbildes.	31
Abb. 8	Röntgenbild (lateral) mit stabilisierter Fraktur.	31
Abb. 9	Torsionsmaschine in Kombination mit der Zwick®-Maschine (dargestellt mit Metallstift).	35
Abb. 10	Einbettung des frakturierten Knochens.	36
Abb. 11	Exemplarische Darstellung einer biomechanisch getesteten Tibia, aus der die torsionale Steifigkeit und das maximale Drehmoment bestimmt werden können.	38
Abb. 12	Histologischer Schnitt einer Rattentibia mit der Versilberung nach von Kossa.	42
Abb. 13	Histologischer Schnitt einer Rattentibia mit der Methylgrün/van Gieson-Färbung.	43
Abb.14	Darstellung der Baseline und der Region of Interest für die Bildanalyse.	45
Abb. 15	Einteilung der Tibiaschaftfraktur nach der AO-Klassifikation.	48
Abb. 16	Einteilung der biomechanisch getesteten Tiere in Anlehnung an die AO-Klassifikation.	49
Abb. 17	Exemplarische Darstellung der Röntgenbilder (laterale Ebene) 42 Tage postoperativ, a) unbeschichtet b) PDLLA c) Simvastatin low dose d) Simvastatin high dose e) BMP-2.	50
Abb. 18	Biomechanisches Ergebnis des maximalen Drehmoments nach 42 Tagen. Die Simvastatin-high-dose-Gruppe weist ein signifikant höheres maximales Drehmoment im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe auf.	53

Abb. 19	Biomechanisches Ergebnis der torsionalen Steifigkeit nach 42 Tagen. Es zeigt sich ein signifikant höheres Ergebnis bei der Simvastatin-high-dose-Gruppe und bei der BMP-2-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe.	54
Abb. 20a	Histologisch sagittaler Schnitt der Gruppe I in der Methylgrün/van Gieson-Färbung, Knorpelige Anteile stellen sich grün dar, mineralisierter Knochen rot. Scale bar: 1mm. PsKa: Periostaler Kallus, Kt: Kortikalis, M: Markraum, EsKa: Endostaler Kallus.	55
Abb. 20b-c	Histologische sagittale Schnitte der Tibiae der Gruppen II bis V nach 42 Tagen in der Methylgrün/van Gieson-Färbung.	56
Abb. 21a-e	Histologische sagittale Schnitte der Tibiae der einzelnen Gruppen nach 42 Tagen in der Versilberung nach von Kossa. Mineralisierter Knochen und Knorpel erscheinen schwarz, nicht-mineralisierter Knorpel und Bindegewebe braun. Scale bar: 1 mm.	57
Abb. 22	Sagittaler Schnitt einer Rattentibia der unbeschichteten Gruppe, gefärbt mit Methygrün/van Gieson. Deutlich zu erkennen der Knorpelanteil mit zahlreichen Chondrozyten (grün/blau dargestellt). Scale Bar: 0,1 mm.	58

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Stadien verschiedener Zellprozesse und die Ausschüttung der daran beteiligten Signalmoleküle während der Frakturheilung.	9
Tab. 2	Gruppeneinteilung des Versuchsvorhabens.	25
Tab. 3	Gewicht und Temperatur während des Untersuchungszeitraums.	48
Tab. 4	Röntgen-Score im zeitlichen Verlauf nach 28 und 42 Tagen.	50
Tab. 5	Ergebnisse Baseline	59
Tab. 6	Ergebnisse Kortikalis	60
Tab. 7	Ergebnisse Gesamtkallus	60
Tab. 8	Ergebnisse periostaler Kallus	61
Tab. 9	Ergebnisse endostaler Kallus	61

10. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich besonders bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert P. Haas für die Möglichkeit, diese Dissertationsarbeit an dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité bzw. dem Julius Wolff Institut durchführen zu dürfen.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich für die exzellente wissenschaftliche Betreuung von Frau PD Dr. rer. nat. Britt Wildemann und Herrn PD Dr. med. Gerhard Schmidmaier, die mir zu jeder Zeit bei allen Fragen sehr hilfsbereit zur Seite standen. Durch ihr großes Engagement wurde mir die Durchführung dieser Dissertation sehr erleichtert.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. Stephan Pauly, der mir freundschaftlich und mit unermüdlicher Geduld bei der Betreuung dieser Arbeit zur Seite stand.

Sehr gute Unterstützung bei den biomechanischen Untersuchungen erhielt ich von Herrn Dipl.-Ing. Jan Erik Hoffmann unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda.

Bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate unterstützten mich hilfreich Frau Gabriele Hardung und ganz besonders, v.a. bei der histomorphometrischen Analyse, Herr Martin Wolny, die mir die Arbeit sehr erleichtert haben.

Bei den Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow und auch den Mitarbeitern des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie / Julius Wolff Institut möchte ich für die nette Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich auch in schwierigen Momenten immer unterstützt hat und am Gelingen dieser Arbeit großen Anteil hat.

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Moritz Morawski, an Eides Statt, dass diese Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung der Frakturheilung unter dem Einfluss von Simvastatin am
Rattenmodell“

von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde und auch nicht in Teilen eine Kopie andere Arbeiten, außer den deutlich gekennzeichneten, darstellt. Alle verwendeten Hilfsmittel und die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den

(Ort, Datum)

Moritz Morawski

Präsentationen

Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Lepre M, Schmidmaier G, Wildemann B:
„Einfluss von Simvastatin in lokaler Applikation von osteosynthetischen Implantaten auf die Frakturheilung“. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2008, Berlin.

Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Lepre M, Schmidmaier G, Wildemann B:
“Influence of statins on fracture healing under local application from osteosynthetic implants”.
54th Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, 2008 San Francisco.