

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

DISSERTATION

Untersuchung der Integration von Simvastatin beschichteten
Implantaten am Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Käßler

aus Bonn

Datum der Promotion: 30.05.2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt.....	6
2	Einleitung.....	10
2.1	Implantate in der orthopädischen Chirurgie – Endoprothesen und Osteosynthesematerialien.....	10
2.2	Komplikationen von Implantaten – Aseptische Lockerung	11
2.3	Verbesserung der Implantatintegration durch Implantatbeschichtung.....	13
2.3.1	Trägermaterial für Beschichtungen – PDLLA als Drug Delivery System ..	14
2.4	Implantatbeschichtung mit knochenanabolen Substanzen	15
2.4.1	Wachstumsfaktoren.....	15
2.4.2	Statine	17
3	Ziel und Hypothese der Arbeit	29
4	Material und Methoden	30
4.1	Tiermodell	30
4.2	Gruppeneinteilung	30
4.3	Implantat	32
4.4	Beschichtung	32
4.5	Operationsaufbau	32
4.5.1	Instrumentarium	32
4.5.2	Narkose	33
4.5.3	Röntgen.....	33
4.5.4	Schmerztherapie.....	34
4.5.5	Sonstiges	34
4.6	Operation	34
4.6.1	Anästhesie	34
4.6.2	Operationstechnik.....	35
4.6.3	Nachsorge.....	37
4.6.4	Röntgenbilder	37
4.7	Tötung und Knochenentnahme	38
4.7.1	Material.....	38
4.7.2	Durchführung.....	38
4.8	Biomechanische Untersuchung	38

4.8.1	Material.....	38
4.8.2	Geräte.....	39
4.8.3	Aufbau.....	39
4.8.4	Durchführung.....	41
4.8.5	Auswertung.....	42
4.9	Histologische Untersuchung.....	43
4.9.1	Material.....	43
4.9.2	Geräte.....	44
4.9.3	Durchführung.....	45
4.9.4	Auswertung.....	49
4.10	Statistik.....	52
5	Ergebnisse.....	53
5.1	Ergebnisse Röntgen.....	53
5.2	Ergebnisse Biomechanik.....	55
5.3	Ergebnisse Histologie.....	58
6	Diskussion.....	62
7	Literaturverzeichnis.....	74
8	Abbildungsverzeichnis.....	83
9	Tabellenverzeichnis.....	85
10	Abkürzungsverzeichnis.....	86
11	Eidesstattliche Versicherung.....	87
12	Lebenslauf.....	88
13	Publikation.....	89
14	Danksagung.....	90

1 Abstrakt

Untersuchung der Integration von Simvastatin beschichteten Implantaten am Rattenmodell

Einleitung: Implantatlockerung ist ein bekanntes Problem in der orthopädischen Chirurgie. Ein Ansatz zur Förderung der Implantatintegration besteht in der Beschichtung von Implantaten mit knochenanabolen Substanzen. Statine, bekannt als cholesterinsenkende Medikamente, haben in in vitro und in vivo Studien knochenanabole Effekte gezeigt. Simvastatin, ein lipophiler Vertreter der Statine, steigert die Expression des Wachstumsfaktors Bone-morphogenetic-Protein-2 (BMP-2) und stimuliert über diesen Mechanismus die Aktivität und Differenzierung von Osteoblasten. Dies erscheint in Bezug auf die Förderung der Knochenneubildung im Rahmen der Frakturheilung und Implantatintegration vielversprechend. Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Wirkung von lokal appliziertem Simvastatin aus dem bioaktiven Trägermaterial Poly-D-L-Laktid (PDLLA) auf die Implantatintegration am Rattenmodell nach 56 Tagen Standzeit mit der Hypothese eines knochenanabolen Effektes.

Methodik: Bei 80 weiblichen Sprague Dawley Ratten erfolgte die retrograde Implantation von Titan-Kirschnerdrähten in das rechte Femur. Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt: Kontrollgruppe ohne Beschichtung, Beschichtung mit PDLLA, PDLLA plus Simvastatin in niedriger (SIM Low - 50µg) und hoher Dosierung (SIM High - 100µg). Nach 56 Tagen Standzeit erfolgte die radiologische, biomechanische und histologische Auswertung.

Ergebnisse: Die biomechanische Testung ergab eine signifikant geringere Fixierungskraft in der SIM High Gruppe gegenüber beiden Kontrollgruppen ($p < 0,05$). Die histologische Untersuchung ergab signifikant geringere gesamte und direkte Knochen-Implantatkontakte der SIM High Gruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen ($p < 0,05$). Es zeigten sich signifikant geringere indirekte Knochen-Implantatkontakte der SIM High Gruppe gegenüber der PDLLA-Gruppe ($p < 0,05$). Die Knochenneubildung in der Bone Area war signifikant geringer in der SIM High Gruppe gegenüber beiden Kontrollgruppen ($p < 0,05$). Der gesamte Knochen-

Implantatkontakt war in der SIM Low Gruppe geringer als in der unbeschichteten Kontrollgruppe, ohne Signifikanz.

Die radiologische Auswertung zeigte in der SIM High Gruppe bei drei Tieren Osteolysen ohne mikrobiologischen Nachweis eines Infektes. Die Kontrollgruppen sowie die SIM Low Gruppe zeigten keine radiologischen Auffälligkeiten.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegen die Hypothese einer Förderung der Knochen-Implantatintegration unter lokaler Beschichtung mit Simvastatin auf dem Trägermaterial PDLLA nach 8 Wochen Standzeit im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Abstract

Evaluation of osseous integration of simvastatin coated implants in a rat model.

Background: Loosening of implants is a major problem in orthopedic surgery. Substances locally applied from implants supporting osseous integration via anabolic bone effects seem to be promising. Statins, well known cholesterol-lowering agents have shown anabolic bone effects in various studies. Simvastatin, a lipophilic statin, increases the expression of Bone-morphogenetic-protein-2 (BMP-2) in osteoblasts. BMP-2 stimulates the activity and differentiation of osteoblasts. Therefore it is important to further investigate the influence of statins on bone formation during the process of implant integration and fracture healing. The aim of the present study was to investigate the effect of simvastatin locally applied from a bioactive coating poly-D-L-Laktid, PDLLA, of titanium implants in rat femora in a radiographic, histologic and biomechanical analysis of their osseous-integration.

Methods: 80 female Sprague Dawley rats received retrograde nailing of the right femur with titanium k-wires uncoated vs. PDLLA coated vs. PDLLA and statin coated in a low and a high dose (SIM Low, 50µg and SIM High, 100µg). After 56 days radiographic, biomechanical and histologic evaluation was performed.

Results: Biomechanical analysis demonstrated significant lower strength of fixation for SIM High group versus both control groups, uncoated vs. PDLLA coating only ($p < 0,05$). Histological analysis showed significant less total and direct bone-implant contacts in SIM High versus both control groups ($p < 0,05$). Indirect bone-implant contacts in SIM High versus PDLLA coating only were significantly reduced ($p < 0,05$). For SIM Low less total bone-implant contacts compared to uncoated control groups were found, without significance. New bone formation was significantly reduced in SIM High versus both control groups ($p < 0,05$).

Radiographic analysis showed osteolysis surrounding the implant in 3 animals of SIM High group, microbiologic analysis showed no bacterial infection. Both control groups and SIM Low group showed no pathologic findings.

Conclusions: The results of the present study falsify the hypothesis of improved osseous integration of orthopedic implants under the influence of locally applied Simvastatin from the bioactive coating PDLLA of intramedullar titanium k-wires in rat femora after 8 weeks when compared to control groups.

2 Einleitung

2.1 *Implantate in der orthopädischen Chirurgie– Endoprothesen und Osteosynthesematerialien*

Gelenkerkrankungen gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen in den Industrieländern und werden nach Angaben der WHO im Jahre 2020 weltweit die viert häufigste Ursache für Behinderungen darstellen (1), (6). Unter den Gelenkerkrankungen steht die Arthrose an erster Stelle. Nach Angaben der Gesundheitsberichterstattung des Bundes sowie des Zentralinstitutes für die kassenärztliche Versorgung zählen die Knie- und Hüftgelenksarthrose zu den zwanzig häufigsten Einzeldiagnosen in orthopädischen Praxen und zu den 30 häufigsten Einzeldiagnosen bei stationären Krankenhausaufenthalten in Deutschland. Zu den Beschwerden der Betroffenen zählen neben Schmerzen die Einschränkungen von Gelenkfunktion und Beweglichkeit, welche zu weiteren behandlungsbedürftigen Beschwerden führen können (6).

Neben der primären Arthrose können auch sekundäre Konditionen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, posttraumatische Fehlstellungen oder angeborene Fehlbildungen, zu gravierenden Einschränkungen oder dem Verlust der intakten Gelenkfunktion führen. Zur Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit und Beweglichkeit der Gelenke sowie zur Schmerztherapie kommen konservative Therapieschemata zum Einsatz. In vielen Fällen führt die konservative Therapie jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. In diesen Fällen kommt der künstliche Gelenkersatz, der Ersatz des zerstörten Gelenkes durch eine Endoprothese zum Einsatz. Die Implantation einer Endoprothese hat dabei die Wiederherstellung der Gelenkfunktion mit Schmerzlinderung, verbesserter Mobilität und Belastbarkeit der betroffenen Extremität zum Ziel.

Die erste Endoprothese wurde im Jahre 1891 von dem Berliner Chirurgen Gluck als künstliches Kniegelenk implantiert (2), (3). Mittlerweile zählt der endoprothetische Gelenkersatz zu dem häufigsten Eingriff in der orthopädischen Chirurgie. Im Jahre 2009 wurden in Deutschland über 210.000 primäre Hüft- und mehr als 175.000 primäre Knieendoprothesen implantiert (5). Im Jahre 2002 waren es noch 150.000 primäre Hüftendoprothesen und 140.000 Knieendoprothesen gewesen (4). Von 2003 bis 2009 stieg die Anzahl der primären Hüft-TEP Implantationen um 18%, die Anzahl der

primären Knie-TEP Implantationen um 52% (5). Über zwei Drittel der primären Hüftendoprothesen und über drei Viertel der primären Knieendoprothesen aus dem Jahr 2009 fielen dabei in die Gruppe der 60-79 jährigen.

Dass die Implantation von Hüft- und Knieendoprothesen zu den 20 häufigsten operativen Eingriffen in Deutschland zählt und Arthrosepatienten damit einen Großteil der Leistungen des Gesundheitssystems beanspruchen (6), spiegelt sich auch in den dadurch entstehenden Kosten für das Gesundheitssystem wider (7). Krankheiten des Muskel- und Skelettsystems stehen nach Angaben des Bundesinstitutes für Qualitätssicherung (BQS), nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen und zerebrovaskulären Erkrankungen an dritter Stelle der gesundheitsbezogenen Kosten. Ein Drittel der Kosten, welche für Krankheiten des Muskel- und Skelettsystems aufgewendet werden entfallen nach Angaben des Institutes auf die Behandlung von Arthrosepatienten. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes betragen die durch Arthrose verursachten Krankheitskosten bereits im Jahre 2008 7 Milliarden Euro. Die diagnosebezogenen Kosten für die Arthrose stehen damit nach den Ausgaben für Hypertonie auf Platz 2 der Krankheitskosten des deutschen Gesundheitssystems, wie dem jährlichen Bericht des Amtes für Gesundheitsberichterstattung des Bundes für das Jahr 2008 zu entnehmen ist. Darüber hinaus stellen degenerative Gelenkerkrankungen einen erheblichen Anteil der Erkrankungen dar, welche ursächlich für Rehabilitationsmaßnahmen, Arbeitsunfähigkeit und Frühberentungen sind (7).

Nach Prognosen des Statistischen Bundesamtes steigt die Zahl der über 60-jährigen in Deutschland von 16,6 Mio. im Jahre 2010 auf 21,6 Mio. im Jahre 2030. Bei steigender Lebenserwartungen und Zunahme von Risikofaktoren ist mit einer Zunahme degenerativer Gelenkerkrankungen und somit des Bedarfs an endoprothetischer Versorgung zu rechnen (8).

2.2 Komplikationen von Implantaten – Aseptische Lockerung

Mit der Anzahl der implantierten Endoprothesen steigt auch die Rate an Komplikationen und die Notwendigkeit für Revisions- und Wechseloperationen (6). Die durchschnittliche Standzeit einer Endoprothese beträgt heute je nach Endoprothesentyp, Alter und Verfassung des Patienten 10 bis 15 Jahre (9). So müssen in den ersten 15 Jahren nach Implantation 10-15 % der Prothesen ausgewechselt werden (10), (11). Bezogen auf das

Jahr 2008 waren dies nach Angaben des Bundesinstitutes für Qualitätssicherung 35.000 von 390.000 Eingriffen in Deutschland.

Eine Studie des wissenschaftlichen Institutes der Techniker Krankenkasse für Nutzen und Effizienz im Gesundheitswesen untersuchte 2009 die Standzeiten von Endoprothesen und veröffentlichte eine Revisionsrate von 3,5% nach primärer Hüft-TEP Implantation und 3,8% nach primärer Knie-TEP Implantation jeweils nach 2 Jahren. Von 2003 bis 2009 stieg die Rate der Revisionsoperationen nach Hüft-TEP Implantation um 43%, die Rate der Revisionsoperationen nach Knie-TEP Implantationen um 117% (5).

Bei der Revision handelt es sich um eine technisch anspruchsvolle Operation, welche häufig eine größere Belastung für die Betroffenen darstellt als die Erstimplantation selbst. Während zu Beginn der Endoprothetik Materialermüdung, Implantatbrüche und Infektionen ursächlich für den Implantatwechsel waren, stellt die Hauptindikation für einen Implantatwechsel heutzutage die aseptische Prothesenlockerung dar (12), (13), (14), (15). Dem nationalen schwedischen Endoprothesenregister zu Folge basieren über 70% aller Hüft- und ca. 50% aller Knierevisionen auf der aseptischen Prothesenlockerung (16), (17), (18), (19).

Bei der aseptischen Lockerung kommt es durch mechanischen Abrieb zwischen Implantat und umliegendem Knochengewebe zur Bildung von sog. Abriebpartikeln, welche ihrerseits eine zelluläre Reaktion hervorrufen und zu einer inflammatorischen Reaktion und Rekrutierung von osteolytisch wirkenden Zellen führen (20), (21). Dieser Vorgang mündet in dem Verlust der Verankerung des Implantates, der Implantatlockerung.

Um die aseptische Prothesenlockerung zu vermeiden bzw. deren Folgen zu vermindern, wird kontinuierlich nach Methoden geforscht, welche den Verbund zwischen Knochen und Implantat, die Implantatintegration bei der unzementierten Einbringung eines Implantates fördern und somit Mikrobewegungen und die Entstehung von Abriebpartikeln minimieren. Ziel ist es, durch die Verminderung der aseptischen Prothesenlockerung eine verlängerte Standzeit der Prothesen zu erreichen und die Anzahl der komplizierten Revisionsoperationen zu senken. Dazu werden Implantate bezüglich ihrer Oberflächenbeschaffenheit, ihrer Form und ihrer Beschichtung

modifiziert, weiter entwickelt und getestet. Ein Ansatz besteht dabei in der Beschichtung von Implantaten mit Substanzen, welche die Implantatintegration fördern.

2.3 Verbesserung der Implantatintegration durch Implantatbeschichtung

Eigenschaften eines Implantates, wie Form, Porosität, Ladung und chemische Zusammensetzung, entscheiden neben dem individuellen Risikoprofil und -Verhalten des Patienten über die Implantateinheilung. Die Veränderung nur einer dieser Eigenschaften kann eine vermehrte oder verminderte Implantateinheilung zur Folge haben. Lange galt die Implantatfixierung durch Zementierung als Meilenstein in der Implantologie, da sie eine sichere und langjährige Implantatfixierung versprach. Heute stellt diese Form der Fixierung bei bestimmten Prothesentypen vornehmlich für ältere Patienten mit eingeschränkter Knochenqualität die Therapie der Wahl dar. Aufgrund einer Prothesenstandzeit von 10 bis 15 Jahren, frühzeitigen Lockerungserscheinungen und der Gefahr der periprothetischen Fraktur mit dann drohender Revision, wird jedoch bei jüngeren Patienten eine zementfreie Implantatintegration angestrebt (10), (11). Hier ist die Implantatintegration, d.h. die Verankerung des Implantates im Knochen durch Herstellung einer biologischen Verbindung zwischen Knochen und Implantat, das Ziel. Dies kann lokal unterstützt werden durch die Beschichtung von Implantaten mit Substanzen, welche die biologische Einheilung des Implantates in den Knochen stimulieren, wodurch ein schnellerer und stabilerer Knochen-Implantat-Kontakt hergestellt wird.

Substanzen, welche die Implantatintegration fördern, werden hinsichtlich der Osteokonduktion, Osteoinduktion und Osteogenese unterschieden (22). *Osteokonduktive* Substanzen besitzen Oberflächeneigenschaften, welche die Anheftung von Zellen in Form eines passiven Vorganges möglich machen. *Osteoinduktive* Substanzen fördern aktiv die Migration und Differenzierung von Zellen zu Osteoblasten. *Osteogene* Substanzen hingegen können zu Osteoblasten differenzieren. Hierdurch kommt es am Übergang zwischen Knochen und Implantat zur Knochenneubildung. Osteoinduktive und osteogene Substanzen sind die Stoffgruppen mit dem höchsten Potential zur Förderung der Implantatintegration und damit im Fokus der Forschungsbestrebungen zur Verbesserung der Implantatintegration. Ein Beispiel

osteoinduktiver Substanzen stellen Wachstumsfaktoren der TGF- β Gruppe dar (23). Aufgrund der ubiquitären, nicht spezifisch auf den Knochen gerichteten proliferativen Wirkung der Wachstumsfaktoren kann ihre systemische Anwendung mit einem hohen Nebenwirkungsspektrum verbunden sein (23). Neben der systemischen Applikationsform kann jedoch auch die lokale Injektion an den gewünschten Wirkort häufig mit Nebenwirkungen und Komplikationen, wie z.B. Infektionen verbunden sein. Die Verabreichung via Trägermaterialien in Form von Kollagenschwämmen, Kathetern oder Minipumpen birgt zusätzlich die Gefahr des Materialversagens. Eine weitere Applikationsform stellt die Anwendung als Beschichtung, eingearbeitet in ein Trägermaterial dar. Hierbei wird die osteoinduktive Substanz in ein Trägermaterial eingearbeitet, welches das einzubringende Implantat als Beschichtung umgibt. Im Rahmen der Implantation wird die osteoinduktive Substanz über die Implantatbeschichtung somit an den gewünschten Wirkort eingebracht (22), (24), (25).

2.3.1 Trägermaterial für Beschichtungen – PDLLA als Drug Delivery

System

Die Anforderungen an ein Trägermaterial für osteoinduktive Beschichtungen beinhalten eine kontrollierte lokale Freisetzung der eingearbeiteten Substanzen ohne Wirkverlust, sowie möglichst keine systemischen und lokalen Nebenwirkungen. Zudem benötigt das Trägermaterial eine hohe mechanische Stabilität, um im Rahmen der Implantation nicht beschädigt zu werden. Ein Trägermaterial, das diesen Anforderungen entspricht, ist Poly(D, L-Laktid) (PDLLA), ein Co-Polymer, welches durch Hydrolyse zu Laktidsäure biodegradiert wird. Dieses Polymer wurde bereits in den 60er Jahren entwickelt und verfügt über eine hohe mechanische Stabilität (20), (26). Zudem lassen sich Substanzen in einem in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten kalten Beschichtungsverfahren in biologisch aktiver Form einarbeiten, ohne dass es zu einem Wirkverlust kommt (27), (28). Dies unterscheidet PDLLA von anderen Trägermaterialien, da so auch thermolabile, hitzeinstabile Stoffe, wie Wachstumsfaktoren, beispielsweise BMP-2, ohne Verlust oder Veränderung der Proteinstruktur und damit der Wirkung, in das Trägermaterial eingearbeitet werden können. Die Freisetzung der eingearbeiteten Substanzen erfolgt via Diffusion und Erosion, dem kontinuierlichen Abbau von PDLLA. Es konnte in vitro gezeigt werden,

dass die in PDLLA eingearbeiteten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β nach einem initialen Peak nach 48 Stunden mit einer Freisetzung von 50% der Wirksubstanz, kontinuierlich über weitere 42 Tage freigesetzt wurden (27), (29).

Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass PDLLA als Trägermaterial für Wachstumsfaktoren eine hohe mechanische Stabilität bei kontinuierlicher Freisetzung der eingearbeiteten Wirksubstanz gewährleistet (23), (30), (31), (32), (33), (34), (35).

Greiner et al. und Pauly et al. zeigten eine vielversprechende Implantatintegration mit in Hydroxylapatit bzw. PDLLA eingearbeiteten Bisphosphonaten und Statinen (36), (37).

Weiterhin ist PDLLA als Trägermaterial für die Wirksubstanz Gentamycin seit Mai 2011 in Form eines Tibiamarknagels (Expert Tibia Nagel ETN PROtect, Fa Synthes) weltweit auf dem Markt.

2.4 Implantatbeschichtung mit knochenanabolen Substanzen

2.4.1 Wachstumsfaktoren

Knochenumbauprozesse im Rahmen der Implantatintegration oder Frakturheilung unterliegen spezifischen physiologischen Abläufen, wobei zwischen primärer und sekundärer Knochenheilung unterschieden wird (22). Im Rahmen der primären Knochenheilung kommt es bei direktem Kontakt der Knochenenden zu einem unmittelbaren Zusammenwachsen. Die sekundäre Knochenheilung lässt sich hingegen in fünf Phasen einteilen. An diesen Phasen im Rahmen von Knochenumbauprozessen sind im Körper vorkommende Wachstumsfaktoren, Bone morphogenetic Proteins (BMPs) regelhaft beteiligt. Die Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren ist den physiologischen Phasen der Knochenheilung zuordenbar, wie in Tab. 1 und 2 dargestellt (38), (39), (40). Analog der Phasen ist es möglich, die Wirkung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren zeitlich einzugrenzen.

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)

Tab. 1: Phasen der Knochenheilung (nach (38))

Heilungsphase	WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung
Inflammation und Hämatombildung	BMP-2/4	In mesenchymalen Zellen des Hämatoms und der Kambiumschicht des Periosts im Fakturbereich. BMP-4-mRNA zeigt sich in Osteoprogenitorzellen des proliferierenden Periosts, der Markhöhle und des Muskels.
	TGF- β 1	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts.
	PDGF	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts.
	aFGF	In Zellen der Kambiumschicht, assoziiert mit einer Zunahme mesenchymaler Zellen.
Kallusbildung und intramembranöse Knochenbildung	BMP-2/4	In Osteoblasten, die den Geflechtknochen nach Fraktur auskleiden. Nimmt mit zunehmender Knochenreifung ab.
	TGF- β 1	In proliferierenden mesenchymalen Zellen, in Osteoblasten und in der Matrix.
	PDGF	Von Thrombozyten freigesetzt. Stimuliert die intramembranöse Knochenbildung.
Chondrogenese	BMP-2/4	In Vorläuferzellen, kurz vor deren Reifung zu Chondrozyten.
	TGF- β 1	In mesenchymalen Zellen, jungen und reifen Chondrozyten.
	IGF-1	In jungen Chondroblasten am Rand des durch Knorpel ersetzten fibrösen Gewebes.
	aFGF	Gebildet von Chondrozyten, ihren Vorläufern und Makrophagen. Stimuliert die Chondrozytenproliferation/-reifung.
Enchondrale Ossifikation	BMP-2/4	Intrazellulär in Osteoblasten der kalzifizierten Knorpelmatrix.
	TGF- β 1	In der Umgebung hypertropher Chondrozyten und in Chondrozyten am Rand der Ossifikationszone.
	bFGF	Möglicherweise von Chondrozyten gebildet. Wichtig für die enchondrale Ossifikation.

Tab. 2: Phasen der Knochenheilung (In Anlehnung an (22) nach (39))

BMPs sind multifunktionelle Glykoproteine, welche unter anderem an der pränatalen Entwicklung chondraler und neuronaler Organsysteme und des Herzens beteiligt sind. Über 20 BMPs aus der Familie der Transforming Growth Factor- β sind bisher bekannt. Die Wirkung der BMPs auf den Knochen wurde 1965 erstmals von M.R. Urist beschrieben (41), (42). Unter den BMPs gilt BMP-2 als wichtiger Stimulator für die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und fördert zudem die Knochenmineralisation. In vitro und in vivo Studien haben die Wirkung des BMP-2 untersucht und knochenanabole Effekte im Rahmen der knöchernen Defektheilung herausarbeiten können (30), (43), (44) (45). Govender et al. führten 2003 eine prospektiv randomisierte klinische Studie an 450 Patienten mit offener Tibiafraktur durch (46). In dieser sog. BESTT-Studie erhielten je ein Drittel der Probanden im Rahmen der osteosynthetischen Versorgung der offenen Tibiafraktur einen unbeschichteten Marknagel. Bei einem weiteren Drittel erfolgte die operative Versorgung durch einen mit 6mg rhBMP-2 beschichteten Marknagel. Das letzte Drittel der Probanden erhielt einen mit 12mg rhBMP-2 beschichteten Marknagel. Die Gruppe mit der höheren rhBMP-2 Dosierung zeichnete sich durch eine signifikant schnellere Knochenheilung sowie durch ein geringeres Risiko für Wundinfektion, Implantatversagen oder Revisionsoperationen aus. 1988 wurde die genetische Sequenz der Bone Morphogenetic Proteins entschlüsselt, seither ist es möglich, diese rekombinant herzustellen (47), (48), (49).

BMP-2 und BMP-7 gehören heute zu den am häufigsten angewendeten Wachstumsfaktoren und sind zudem als einzige Substanzen aus der Gruppe der Bone-Morphogenetic-Proteins für die klinische Anwendung zugelassen. BMP-2 ist als Dibotermis alfa/InfectO zur Therapie von Knochenheilungsstörungen nach offenen Tibiafrakturen bereits seit 2004 auf dem Markt (Arzneiverordnungsreport 2004 (50)). BMP-7 ist als Eptotermis alfa/Osigraft zur Behandlung von traumatisch bedingten Tibiapseudarthrosen mit assoziierten Beschwerden über mindestens 9 Monate nach frustrierender oder nicht durchführbarer Transplantation von autologer Spongiosa zugelassen (50). Die Erstzulassung erfolgte bereits 2001 durch die Europäische Arzneimittelagentur (EMA). Die einmalige Anwendung von BMP-7 ist mit Kosten in Höhe von 5402,72 Euro verbunden (51). Die klinische Anwendung von BMP-7 ist nur in speziellen Fällen nach Versagen der Standardtherapie zugelassen. Im Rahmen der Forschungsbestrebungen zur Verbesserung der Implantologie in der Zahnheilkunde erfolgte ebenfalls eine Fokussierung auf BMP-2. So konnten Thorey et al. zeigen, dass die lokale Applikation von BMP-2 nach 28 Tagen eine verbesserte Implantatintegration zur Folge hat (52), (53).

Das Nebenwirkungsspektrum der Wachstumsfaktoren ist bis dato nicht abschließend geklärt, so dass die Anwendung bei schwangeren Frauen, sowie Patienten mit positiver Tumoranamnese kontraindiziert ist. Die klinische Anwendung ist streng limitiert und zudem ausgesprochen kostenintensiv. Hieraus erklärt sich die fortlaufende Suche nach alternativen Substanzen mit ähnlichem Wirkprofil.

2.4.2 Statine

Auf der Suche nach einem neuen Medikament zur Therapie der Osteoporose wurden im Jahre 1999 im Rahmen eines Screenings über 30.000 Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Expression des Wachstumsfaktors Bone-Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) zu stimulieren (106). Lovastatin, ein Medikament aus der Gruppe der Statine, zeigte im Rahmen dieses Screenings die Fähigkeit zur Triggerung des BMP-2 Promotors. Diese Wirkung der Statine auf das Skelettsystem wurde 1999 erstmals von Mundy et al. (106), (48) publiziert. Weitere Studien zeigten, dass neben Lovastatin auch andere Vertreter der Statine, Simvastatin, Fluvastatin und Mevastatin, einen dosisabhängig knochenanabolen Effekt aufweisen. Da nur lipophile Statine eine knochenanabole Wirkung zeigen, ist es wichtig, die Substanzen dieser Wirkstoffgruppe hinsichtlich Lipidlöslichkeit, Halbwertszeit und Potenz zu unterscheiden. Lipophile

Statine wie Simvastatin (54) zeigen eine knochenanabole Wirkung und fördern durch Triggerung des Promotors des BMP-2 Gens die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, die Knochenmineralisation und die Expression des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in Osteoblasten (s. Abb. 1 (55)).

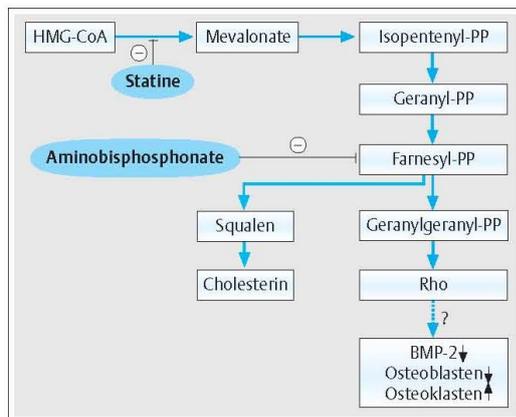


Abb. 1: Schema Statinwirkung auf den Knochen nach (56)

Aufgrund der guten Verträglichkeit von Simvastatin und der Tatsache, dass es sich hierbei um ein bereits seit vielen Jahren klinisch zugelassenes Medikament handelte, galt Simvastatin nach der ersten Publikation von Mundy im Jahre 1999 als besonders vielversprechend für die muskuloskeletale Chirurgie. Darüber hinaus ist die klinische Anwendung vergleichsweise kostensparend. Es folgten weitere Untersuchungen dieser Substanz bezüglich ihrer Wirkung auf das Skelettsystem, initial insbesondere auf die Frakturheilung und eine mögliche Verringerung des Frakturrisikos.

Mundy et al. zeigten, dass eine Applikation von Simvastatin am Mausmodell eine Steigerung der Osteoblastenzahl, sowie eine Steigerung der Knochenneubildung von fast 50% hervorrief. Es folgten weitere in vitro Studien welche einen knochenanabolen Effekt unter Statin Applikation in unterschiedlichen Dosierungen zeigten (57) (58). Ohnaka et al. zeigten dabei zudem eine vermehrte Expression von BMP-2 und Osteocalcin (59).

Weitere tierexperimentelle Studien konnten bei unterschiedlicher Applikationsform der Statine knochenanabole Effekte am Frakturmodell (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67), (61), (65) und Implantatmodell (68), (69), (70), (71), (72), (73), (74), (75), (76) nachweisen. Im Rahmen einer experimentellen Frakturstudie an der Ratte konnten dosisabhängige knochenanabole Effekte unter lokaler Simvastatin Applikation gezeigt

werden (37). Es zeigte sich ein signifikant höheres maximales Drehmoment und eine ebenfalls signifikant erhöhte torsionale Steifigkeit nach lokaler Simvastatin Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch einer BMP-2 Gruppe. Die histologische Untersuchung dieser Arbeit stützte die Aussage, dass Simvastatin dosisabhängig einen positiven Effekt auf die Knochenheilung zeigt. Uzzan et al. fanden im Rahmen einer Metaanalyse von 21 Studien ähnliche Ergebnisse mit Darstellung einer erhöhten Knochendichte unter Statintherapie (77). Entsprechende Ergebnisse veröffentlichten Wang et al nach Darstellung eines verringerten Risikos für das Auftreten von Schenkelhalsfrakturen unter oraler Statineinnahme (78). Bei weiteren Studien zur Frakturheilung (79) bzw. Reduktion des Frakturrisikos (80), (81), (82) und zur Implantatintegration (83) konnte die knochenanabole Wirkung der Statine jedoch nicht gezeigt werden.

Statine - Wirkmechanismus

Statine hemmen kompetitiv das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und werden auch als HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bzw. Cholesterinsyntheseenzymhemmer (CSE-Hemmer) bezeichnet (85). HMG-CoA ist ein Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese und durch die Hemmung der HMG-CoA Reduktase kommt es zu einer verminderten intrazellulären Synthese von Cholesterin (s. Abb. 2).

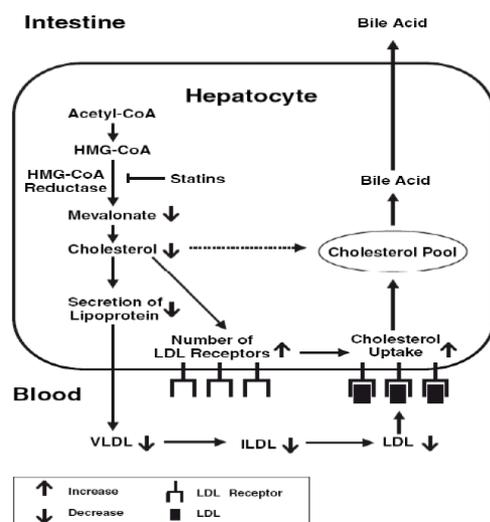


Abb. 2 Schema Cholesterinbiosynthese (nach Horiuchi (89))

Dies hat eine verstärkte Expression von LDL-Rezeptoren an der Oberfläche der Leberzellen und somit bei einer verstärkten Aufnahme in die Zellen eine Reduktion des Cholesterins im Blut zur Folge (85). Die Reduktion des Cholesterins beträgt 25%, des LDL-Cholesterins 30%, die Senkung der Triglyzeride bis zu 40% (86). Zudem kommt es zu einem Anstieg des HDL-Cholesterins um bis zu 10% (87). Statine unterliegen einem ausgeprägten First-Pass Effekt der Leber, wodurch bei systemischer Gabe mit einem hohen Wirkverlust zu rechnen ist. Das Ausmaß der Metabolisierung ist abhängig von der Pharmakokinetik der einzelnen Statine. Den höchsten First-Pass Effekt weisen lipophile Statine wie Simvastatin und Lovastatin auf, welche erst in der Leber hydrolisiert und damit in ihre aktive Form versetzt werden. Die Ausscheidung der Statine erfolgt bei einer renalen Ausscheidung von weniger als 10% überwiegend enteral (88).

Statine - Pleiotrope Effekte

Neben der lipidsenkenden Wirkung verfügen Statine über zusätzliche extrahepatische, sog. pleiotrope Effekte, welche unabhängig von ihrer Wirkung auf den Fettstoffwechsel sind. Zu diesen pleiotropen Effekten zählen die Senkung der Thrombozytenaggregation, die Förderung der Angiogenese, eine vasodilatative, antiproliferative, immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung (90), (91), (92), (93). Darüber hinaus steht die Produktion des β -Amyloid-Peptids, welches in der Genese der Alzheimer Erkrankung eine wichtige Rolle spielt, mit der Wirkung von Statinen in Zusammenhang (94). Nur lipophile Statine wie Simvastatin verfügen über diese pleiotropen Effekte. Der genaue Wirkmechanismus der pleiotropen Effekte von Statinen ist nicht gänzlich geklärt, jedoch steht fest, dass die Wirkung über die Hemmung von Zwischenprodukten des Mevalonatstoffwechsels geschieht, unabhängig von der Cholesterinbiosynthese. Bei diesen Zwischenprodukten handelt es sich um sog. Isoprenoide. Diese sind wichtig für die Modifikation von Proteinen, wobei letztere u.a. eine Rolle für die Regulation von Zellwachstum und -Differenzierung spielen (85), (91).

Statine - Anwendungsgebiet

Aufgrund des Wirkprofils werden Statine bislang hauptsächlich im Bereich von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt. Statine senken zudem nachweislich die

Morbidität und Mortalität in Verbindung mit der koronaren Herzerkrankung (86) und werden zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit Risikoprofil, wie auch zur Sekundärprophylaxe regelhaft eingesetzt. Ausschlaggebend für diese therapeutische Anwendung war die im Jahre 1994 an 4444 Patienten über 5 Jahre durchgeführte Scandinavian Simvastatin Survival Study 1994, die 4S Studie (95). Laut der Studie sank das Mortalitätsrisiko der Studienteilnehmer mit kardiovaskulärem Risikoprofil um 30%, das koronare Mortalitätsrisiko um 42% unter Statineinnahme. Es kam zu einer Reduktion des Gesamtcholesterins, L-DL und Triglycerid Cholesterins von 25%, 35% und 10%, und HDL Anstieg von 8%. 2002 wurde die Heart Protection Study veröffentlicht (96). 20.000 Probanden wurde über eine Dauer von 5 Jahren täglich eine Dosis von 40mg Simvastatin bzw. Placebo verabreicht. Hierunter zeigte sich eine Reduktion der Rate an Myokardinfarkten und Schlaganfällen um 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der Care-Studie (97) sowie Lipid-Studie (98) zeigten bereits 1996 bzw. 1998 ähnliche Ergebnisse.

Daten aus dem Jahr 2010 bestätigen eine Reduktion des Risikos für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse unter Statineinnahme im Rahmen einer Metaanalyse von 170.000 Patienten aus 26 randomisierten Studien (99).

Grundsätzlich lassen sich bei der Anwendung von Statinen die systemische (orale oder transdermal) von der lokalen Form unterscheiden. Im Rahmen ihrer klassischen Indikation zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse erfolgt die Statingabe per oral in Tablettenform. Hierbei ist die typische Anwendung die abendliche Gabe, da die endogene Cholesterinbiosynthese nachts ihren Höhepunkt erreicht. Statine zählen weltweit zu den meist verschriebenen Medikamenten. Simvastatin stand nach der Erstzulassung in den USA 1991 durch die Firma Merck & Co lange Zeit an erster Stelle der am häufigsten verordneten Medikamente weltweit. Nach Auslaufen des Patents 2006 und zunehmendem Einsatz von Generika, verlor es diese führende Marktposition (100). Laut Arzneiverordnungs-Report 2010 (101) standen die Lipidsenker 2010 an Platz 13 der verordnungstärksten Medikamentengruppen mit einem Jahresumsatz von 708 Mio. Euro.

Statine - Nebenwirkungen

Allgemein handelt es sich bei den Statinen um gut verträgliche Medikamente (88). Nebenwirkungen der Statine umfassen Leberschäden, Kopfschmerzen, Übelkeit,

Müdigkeit, Schlafstörungen, Sodbrennen, Blähungen, Bauchschmerzen, Verstopfung, Durchfall, Gelenkschmerzen, Lichtempfindlichkeit, Blutarmut, Nervenschädigungen und Haarausfall. Ebenfalls zu beachten sind Interaktionen mit Wirkstoffen, welche intrahepatisch über das Cytochrom P-450 System metabolisiert werden (Erythromycin, Cyclosporin, Methotrexat). Dies gilt insbesondere für die lipophilen Statine (88).

Eine schwerwiegende und unter Umständen lebensbedrohliche Nebenwirkung von Statinen ist die toxische Myelopathie mit ihrer schwersten Form, der Rhabdomyolyse. Hierbei handelt es sich um die Myolyse der quergestreiften Muskulatur mit Muskelschwäche und -Schmerzen, abgeschwächten Muskeleigenreflexen und Myoglobinurie. Dabei kommt es zur Schwellung, Degeneration und Nekrose von quergestreiften Muskelfasern mit der drohenden Komplikation eines akuten Nierenversagens (87), (88). In Deutschland kam es bis 2001 zu 90 Fällen von Rhabdomyolyse assoziiert mit der Einnahme von Cerivastatin (Handelsname Lipobay). International wurden 52 Todesfälle aufgrund der Einnahme dieses Statins bekannt und führten 2001 zu einem Rückzug der Zulassung durch die Firma Bayer (102). Eine gleichzeitige Einnahme von Statinen und Fibraten erhöht das Risiko für das Auftreten einer Rhabdomyolyse (87), (102). Kontraindikationen für die Statineinnahme sind daher Muskelerkrankungen, Leberschäden, sowie Unverträglichkeitsreaktionen. Da Cholesterin essentiell für die fetale Entwicklung während der Schwangerschaft ist, ist die Einnahme von Statinen in der Schwangerschaft kontraindiziert. Studienergebnisse von Manson aus dem Jahre 1996 suggerieren jedoch, dass bei einer Einnahme von Simvastatin in therapeutischer Dosis während der Schwangerschaft keine Nebenwirkungen auftreten (103).

Studienübersicht Frakturmodelle

Garret et al. (66) applizierten mit Lovastatin beschichtete Nanopartikel lokal in Femurfrakturen am Rattenmodell und konnten eine Stimulierung des Knochenwachstums unter einer Konzentration von 5ng/ml Lovastatin in vitro herausarbeiten. Bei einmaliger Injektion in den Frakturspalt zeigte sich im mikro-CT eine schnellere Frakturheilung, sowie eine kleinere kortikale Defektzone 4 Wochen posttraumatisch im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Statinapplikation.

Gutierrez et al. (65) untersuchten die transdermale versus orale Applikation von Lovastatin auf die Frakturheilung am Rattenmodell nach Femurfrakturen. Fünf Tage postoperativ erfolgte die transdermale Applikation von 0,1-5mg/kg KG, bzw. die orale Applikation von 5-25mg/kg KG Lovastatin. 2 und 6 Wochen postoperativ erfolgte die radiologische, histologische und biomechanische Auswertung. Die radiologische Auswertung zeigte eine deutlich vermehrte Kallusbildung der mit Lovastatin transdermal behandelten Gruppe nach 6 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei ebenfalls erhöhter Knochendichte. Die Steifigkeit der Lovastatingruppe war 90% höher als die der Kontrollgruppe, die zur Frakturierung des Knochens benötigte Kraft war in der Lovastatingruppe 42% höher als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe der oralen Lovastatin Zuführung zeigte sich bei Dosierungen von 10-25mg/KG eine signifikant erhöhte Steifigkeit.

Pauly et al. (37) untersuchten den Effekt von lokal appliziertem Simvastatin aus dem biodegradierbaren Trägermaterial PDLLA auf die Frakturheilung am Rattenmodell. Unbeschichtete, sowie mit 3µg und 50µg Simvastatin, sowie 50µg BMP-2 beschichtete K-Drähte wurden in Rattentibiae implantiert und nach 28 bzw. 42 Tagen biomechanisch und histomorphometrisch getestet. Die radiologischen Nachkontrollen ergaben Hinweise auf schnellere Kallusbildung in beiden Untersuchungsgruppen mit Simvastatin und BMP-2 Applikation. Die biomechanische Testung ergab signifikant erhöhte Torsionssteifigkeit und maximales Drehmoment der Gruppe mit der höheren Simvastatin Dosierung an Tag 28 und 42. Die mit BMP-2 behandelten Knochen zeigten signifikant höhere Torsionssteifigkeit an beiden Untersuchungszeitpunkten, sowie signifikant erhöhten maximalen Drehmoment zum ersten Untersuchungszeitpunkt.

Piskin et al. (67) untersuchten den Einfluss von Simvastatin auf dem Trägermaterial Polycaprolakton auf die kraniale Defektheilung am Rattenmodell. Hierbei handelte es sich um Scaffolds, welche in eine Simvastatin Lösung mit einem Simvastatingehalt von 20µg getaucht wurden. Nach 1, 3 und 6 Monaten erfolgte die radiologische und histologische Analyse der Knochenregeneration in dem ca. 8mm durchmessenden kranialen Knochendefekt. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Anstieg der Knochenmineralisierung in der Gruppe der mit Simvastatin behandelten Defekte gegenüber den Kontrollgruppen.

Serin-Kilicoglu et al. (64) applizierten 1 bzw. 2mg Simvastatin lokal subkutan im Bereich der Frakturzone nach geschlossener Tibiafraktur ohne Frakturstabilisierung am

Rattenmodell im Bereich der Fraktur am Trauma-Tag, sowie am Tag 1-4 posttraumatisch. Nach einer Standzeit von 7, 14 und 21 Tagen erfolgte die histologische Auswertung. Die Bildung und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen war in den mit Simvastatin behandelten Gruppen signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Skoglund et al. (60) verabreichten 120mg/kg KG Simvastatin per oral am Frakturmodell der Maus nach Femurmarknagelung. Nach 8, 14 und 21 Tagen erfolgte die biomechanische und histologische Analyse der Frakturheilung. Nach 8 Tagen erwies sich die biomechanische Auswertung als noch nicht durchführbar bei zu instabilem Knochenmaterial. Nach 14 Tagen zeigte der Kallus einen um 53% größeren transversalen Durchmesser, sowie signifikant höhere Knochensteifigkeit als die Kontrollgruppe. Die zum erneuten Bruch des Knochens benötigte Kraft war 63% größer als in der Kontrollgruppe. Nach 21 Tagen waren die Frakturen konsolidiert, signifikante biomechanische Unterschiede ließen sich nicht mehr darstellen. Die gleiche Arbeitsgruppe applizierte 0,1mg/kg KG Simvastatin lokal via Minipumpe nach Femurfraktur am Mausmodell in den Bereich der Frakturzone. Es zeigten sich signifikant bessere biomechanische Eigenschaften als in der Kontrollgruppe nach einer Standzeit von 14 Tagen (63).

Wang et al. (61) applizierten 10mg/kgKG Simvastatin subkutan im Bereich zuvor gesetzter Tibiafrakturen an ovariectomiertem Rattenmodell für 5 Tage 1x täglich. Nach 7 Tagen Standzeit zeigte sich in der histologischen Auswertung eine signifikante Zunahme des mineralisierten Knochens, sowie eine signifikante Zunahme der Kallusbildung um 21,3%. Nach 14 Tagen Standzeit zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kallusbildung um 21,5% in der mit Simvastatin therapierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Der Maximum Load war nach 14 Tagen um 57,5% gestiegen, nach 4 Wochen noch um 31,4%.

Wong et al. (62) untersuchten die Knochenneubildung in parietalen Knochendefekten an Kaninchen nach Defektauffüllung mittels 0,2ml gelöstem Simvastatin (aus 10mg Tabletten) mit einer Konzentration von 2,5mg/ml. Nach 14 Tagen Standzeit ergab die histologische Auswertung eine 308% fache Knochenneubildung in der mit Simvastatin behandelten Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen mit lediglich Kollagen.

Im Gegensatz zu diesen Studienergebnissen blieb bei Patil et al. nach oraler Simvastatingabe ein knochenanaboler Effekt auf die Frakturheilung aus. Patil et al (79) führten zur Untersuchung des Effektes von oral appliziertem Simvastatin auf die

Frakturheilung 2009 eine prospektiv randomisierte klinische Studie an 80 Patienten mit nicht dislozierter, extraartikulärer distaler Radiusfraktur durch. Hierbei erfolgte die orale Applikation von 20mg Simvastatin täglich, sowie klinische und radiologische Verlaufskontrollen über 12 Wochen. Zwei bzw. 12 Wochen postoperativ erfolgte die Knochendichtemessung. Für die Studiengruppe unter oraler Simvastatin Therapie betrug die mittlere Dauer zur radiologisch diagnostizierten Frakturheilung 71,6 Tage, bei der Gruppe ohne Simvastatin Therapie waren es 71,3 Tage. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Frakturheilung nicht dislozierter, extraartikulärer distaler Radiusfrakturen unter oraler Aufnahme von 20mg Simvastatin täglich über 12 Wochen festgestellt werden.

Studienübersicht Implantatmodelle

Masuzaki et al. (70) wendeten eine Kombination aus einem injizierbaren Poly-laktid (-co-glycolic Säure) als Trägermaterial für Fluvastatin als einmalige perkutane Injektion von 0,5mg/kg versus 1,0mg/kg Fluvastatin zur Untersuchung der Osteogenese nach Einbringen eines Titanimplantates in Rattentibiae. Nach 14 bzw. 28 Tagen zeigte sich eine signifikante Knochenneubildung um das Titanimplantat. Zusätzlich konnte eine gesteigerte mechanische Knochenstabilität dargestellt werden.

Du et al. (71) untersuchten den Effekt von oral appliziertem Simvastatin auf die Implantatintegration in osteoporotischen Ratten. 56 Tage nach Ovariectomie erfolgte das Einbringen von Titankirschnerdrähten in die Rattentibiae, sowie die Gabe von 5mg/kg Simvastatin täglich per os. Nach 28 bzw. 84 Tagen ergab die Messung des Knochen-Implantat-Kontaktes, der Bone-Area sowie der Knochendichte in dem spongiosen Knochen eine deutliche Zunahme dieser Parameter unter Simvastatin-Behandlung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Es zeigte sich eine signifikant verbesserte Osteointegration der Titanimplantate in osteoporotischen Ratten unter oraler Simvastatin Applikation.

Başarır et al. (72) verglichen die bilaterale Implantatintegration eines Titanzylinders in Kaninchenfemora unter subkutaner Applikation von 50mg/kg KG Simvastatin. Nach 6 Wochen Standzeit erfolgte die radiologische, sowie histologische und biomechanische Untersuchung. Die Fixierungskraft ergab signifikant höhere Ergebnisse für die Simvastatin-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Im Rahmen der histologischen

Auswertung wurde der direkte Knochen-Implantat Kontakt in Prozent als Osteointegration angegeben und zeigte sich in der Simvastatin-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Moriyama et al. (73) testeten den Effekt der lokalen Applikation des Statins Fluvastatin in drei unterschiedlichen Dosierungen (3µg, 15µg, 75µg) auf dem Trägermaterial PGA (Propylene-Glycol-Alginat) auf die Implantatintegration in Rattentibiae. Nach einer Standzeit von einer Woche zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem Knochen-Implantatkontakt, bei signifikant erhöhtem, das Implantat umgebende Knochenvolumen, sowie eine signifikant erhöhte Push-Out Kraft in der Gruppe mit der höheren Fluvastatin Konzentration (15µg). Nach einer Standzeit von zwei Wochen zeigte sich signifikant erhöhter Knochen-Implantat Kontakt, Knochenvolumen und Push-Out Kraft der Gruppe mit der höchsten Fluvastatin Konzentration (75µg) gegenüber den Kontrollgruppen ohne Statine.

Im Jahre 2010 veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe (74) Ergebnisse einer Studie mit lokaler Applikation von Fluvastatin in Gelformat vor Einbringen eines Implantates in Rattentibiae mit diesmal vier unterschiedlichen Dosierungen. Die Standzeit betrug 1, 2 und 4 Wochen. Untersucht wurde der Knochen-Implantat-Kontakt, das Volumen mineralisierten Knochens, sowie die Push-Out Kraft. Nach 7 Tagen Standzeit zeigte sich eine signifikante Abnahme des mineralisierten Knochens in der Gruppe der höchsten Fluvastatin Dosierung (300µg). Nach zwei Wochen Standzeit zeigte sich jedoch ein signifikant erhöhter Knochen-Implantat Kontakt sowie eine signifikante Zunahme des mineralisierten Knochens in der Fluvastatin Gruppe mit 75µg. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach 4 Wochen Standzeit. In beiden von Moriyama et al. verwendeten Studien fand Fluvastatin Anwendung.

Gutierrez et al. (76) beobachteten bei transdermaler Gabe von Lovastatin am Rattenmodell in den Dosierungen 0.01-5 mg/kg über 5 Tage eine 30-60%ige Zunahme des trabekulären Knochenanteils. Weitere 4 Wochen später zeigte sich eine 150%ige Zunahme der Knochenneubildung. Verzeichnet wurde zudem die signifikante Zunahme des Serumosteocalcins, eines Markers für Knochenneubildung.

Akuyawa et al. (68) veröffentlichten die Ergebnisse der Implantatintegration bei bilateraler Implantation von K-Drähten in Rattentibiae unter intraperitonealer Applikation von 10mg/kg Simvastatin. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte histologisch durch

Ausmessung des Knochen-Implantat-Kontaktes, sowie der Knochendichte nach 30 Tagen Standzeit. Für die mit Simvastatin behandelte Gruppe zeigten sich signifikante Knochenneubildung periimplantär, sowie eine höhere Knochendichte.

In 2010 folgten an gleichem Tiermodell von Ayukawa et al. die Untersuchung mit den Dosierungen von 0.125, 1, 5 bis 10mg/kg Simvastatin intraperitoneal, wobei analog zu den Ergebnissen von 2003 nach 30 Tagen signifikante Knochenneubildung periimplantär bei den Dosierungen 5-10mg/kg zu verzeichnen waren (69).

Lee et al. (84) untersuchten die lokale supraperiostale Applikation von Simvastatin in den Dosierungen 0,1mg, 0,5mg, sowie 1mg im Bereich der Mandibula am Rattenmodell auf einem Träger aus Zellulose und Polylaktid, bzw. ohne Träger im Sinne eines beschichteten Implantates. Bei jedem Tier erfolgte kontralateral die supraperiostale Injektion von einmalig 0,5mg, sowie 0,1mg versus 0,5mg dreimal wöchentlich. Die histologische und biomechanische Analyse nach 3, 7, 24 bzw. 90 Tagen zeigte ein signifikant größeres Areal neu gebildeten Knochens in der Gruppe mit multiplen Simvastatin Injektionen à 0,5mg nach 24 Tagen gegenüber einmaliger Injektion von 0,5mg, sowie gegenüber multiplen Injektionen à 0,1mg Simvastatin. Hier zeigte sich neben dem signifikant größeren Areal neugebildeten Knochens eine signifikant erhöhte biomechanische Stabilität. Neunzig Tage post injectionem zeigte sich signifikant weniger Knochenneubildung nach multiplen Simvastatin Injektionen im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt nach 24 Tagen. Nach wie vor zeigte sich eine ausgeprägtere Knochenneubildung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Die biomechanischen Ergebnisse waren äquivalent.

Gegensätzliche Ergebnissen fanden Cottrell et al et al. (83). Sie führten die Implantatbeschichtung mit Lovastatin (11,56mg versus 1,3mg), Alendronat und Omeprazol nach lokalem kortikalem Defekt im Bereich des distalen Femurs am Rattenmodell durch. Es erfolgte die bilaterale Implantation eines K-Drahtes jeweils mit einer der o.g. Beschichtung vs. ohne Beschichtung. Es erfolgte die radiologische Auswertung des Femurs bei einliegendem beschichtetem Implantat mittels mikro-CT unter Bestimmung von Knochendichte und Knochenmineralisation. Zusätzlich erfolgte die histologische Ausmessung der Knochenneubildung nach Anfärbung der erstellten Präparate mit Färbung nach van Gieson. Bezüglich der mit Lovastatin beschichteten Implantate wurde kein positiver Einfluss auf die Knochenheilung unter Applikation von 0,001mg/kg nach 3 Wochen Standzeit erzielt.

3 Ziel und Hypothese der Arbeit

Ziel

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung mit Simvastatin beschichteter Implantate hinsichtlich der Knochen-Implantatintegration am Rattenmodell.

Diese Beschichtung, bestehend aus einer biodegradierbaren PDLLA (Poly-D, L-Laktid)-Beschichtung und dem Statin Simvastatin in zwei unterschiedlichen Dosierungen, wurde radiologisch, biomechanisch und histologisch auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Implantatheilung nachhaltig zu begünstigen.

Hypothese

Durch die lokale Applikation von Simvastatin aus einer biodegradierbaren Implantat-Beschichtung mit der Trägersubstanz PDLLA wird die Implantatintegration am Rattenmodell beschleunigt. Daraus resultiert in der radiologischen, biomechanischen und histologischen Untersuchung ein schnellerer und stabilerer Implantat-Knochenkontakt im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Beschichtung und der Gruppe mit der Trägersubstanz PDLLA.

4 Material und Methoden

4.1 Tiermodell

Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an ein bereits erprobtes Versuchstiermodell der Arbeitsgruppe (104). Im Rahmen der Versuche wurden 80 Tiere biomechanisch und histologisch getestet. Hierbei handelte es sich um ca. 5 Monate alte weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 230 und 270 Gramm. Diese Versuchstierart wird durch die Harlan Winkelmann GmbH speziell für die Forschung gezüchtet (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland).

Zur Eingewöhnung wurden die Tiere zunächst für 10 Tage in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem künstlichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, einer artgerechten Umgebungstemperatur von 22° Celsius in Typ 3 Käfigen zu je 5 Tieren. Wasser und Futter (V-Alleinfutter für Ratten/Mäuse-Haltung, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) standen den Tieren frei zur Verfügung.

Im Rahmen der Operation wurden den Tieren Titan-Kirschnerdrähte retrograd in das rechte Femur implantiert (s. Kap. 4.6). Nach 56 Tagen Standzeit wurden die Tiere euthanisiert und die entnommenen Femora biomechanisch und histologisch getestet. Die Durchführung dieser Versuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G 0174/ 07 am 08.06.2007 genehmigt.

4.2 Gruppeneinteilung

Die 80 Versuchstiere wurden in vier Gruppen eingeteilt und nach dem Zufallsprinzip nummeriert. 20 Tieren wurde ein unbeschichteter Titan-Kirschnerdraht implantiert (Gruppe I), weiteren 20 Tieren ein mit 1mg PDLLA-beschichteter Titan-Kirschnerdraht (Gruppe II). Die verbleibenden 40 Tiere wurden in zwei Gruppen á 20 eingeteilt, wobei 20 Tieren ein mit 50µg Simvastatin (SIM Low) und 20 Tieren ein mit 100µg Simvastatin (SIM High) beschichteter Titan-Kirschnerdraht implantiert wurde (s. Tab. 2 Gruppeneinteilung und Versuchsplan). Grundlage der Simvastatin Beschichtung war jeweils die Beschichtung mit 1mg PDLLA. Der Anteil der Beschichtung des Titan-Kirschnerdrahtes bezogen auf die gesamte Beschichtung betrug in der mit PDLLA beschichteten Gruppe 100% PDLLA, in der SIM Low Gruppe 5% Simvastatin und in der

SIM High Gruppe 10% Simvastatin (s. Tab. 3 Beschichtungen). Aus allen Gruppen wurden je 10 Tiere der biomechanischen und 10 Tiere der histologischen Testung zugeführt.

Gruppe n=10	Implantat	Tag 1	Tag 56 – EX
Ia	Ohne Beschichtung	OP	Biomechanik
Ib	Ohne Beschichtung	OP	Histologie
IIa	PDLLA (100%)	OP	Biomechanik
IIb	PDLLA (100%)	OP	Histologie
IIIa	SIM Low (5%)	OP	Biomechanik
III b	SIM Low (5%)	OP	Histologie
IV a	SIM High (10%)	OP	Biomechanik
IV b	SIM High (10%)	OP	Histologie

Tab. 2: Gruppeneinteilung und Versuchsplan

Beschichtung	Anteil an Beschichtung (%)	Absolutwert (μg)
PDLLA	100%	1mg/Nagel
SIM Low	5%	50 μg /Nagel
SIM High	10%	100 μg /Nagel

Tab. 3: Beschichtungen

Als Untersuchungszeitpunkte dienten der OP-Tag, Tag 1 und Tag 56. An diesen Tagen wurden jeweils die Temperatur und das Gewicht der Tiere gemessen, sowie Röntgenbilder der rechten Femora in zwei Ebenen angefertigt (s. Kapitel Röntgenbilder). An Tag 56 erfolgte nach der Euthanasie die biomechanischen Testung, bzw. Vorbereitung der Knochen für die histologische Testung.

4.3 Implantat

Als Implantat wurden titanlegierte Kirschnerdrähte mit einem Durchmesser von 1,4mm der Firma Synthes (Synthes, West Chester, USA) verwendet. Diese wurden unbeschichtet als Kontrollgruppe, beschichtet mit der Trägersubstanz PDLLA, oder mit PDLLA und zusätzlich Simvastatin in 2 unterschiedlichen Konzentrationen, 50µg in der Gruppe SIM Low bzw. 100µg in der Gruppe SIM High angewendet.

4.4 Beschichtung

PDLLA

Als Trägermaterial für die Beschichtung wurde Poly(D, L-Laktid) (PDLLA), Resomer 203 mit einem Molekulargewicht von 30,000 Dalton, hergestellt durch die Firma Boehringer, (Firma Boehringer, Ingelheim, Deutschland) verwendet.

Bei der Herstellung der Implantatbeschichtung wurden 100mg PDLLA in 1,5mL Chloroform bei Raumtemperatur gelöst und die Lösung steril gefiltert (29).

Simvastatin

Das sterile, lipophile Statin Simvastatin wurde in der PDLLA/Chloroform Beschichtungslösung bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration von 50µg (SIM Low) bzw. 100µg (SIM High) gelöst. Die Titankirschnerdrähte wurden zweimal in die Lösung aus PDLLA und Simvastatin getaucht und unter laminar air flow Bedingungen getrocknet (29), (37).

4.5 Operationsaufbau

4.5.1 Instrumentarium

- Softasept N, B-Braun (Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Unsterile Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl. New Brunswick, USA)
- Sterile OP-Handschuhe, Gammex PF (Ansell Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien)
- OP-Tuch unsteril
- OP-Tuch, steril, Foliodraperie 75x90cm (Hartmann Protect, Neuhausen, Deutschland)

- Einmalskalpell No.15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Präparierschere
- Kleine Chirurgische Pinzette
- Nadelhalter
- 1,4mm Titan-Kirschnerdraht (Synthes, West Chester, USA)
- Handbohrer (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Bohrspitzen, Spiralbohrer \varnothing 1,2mm (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Kneifzange
- Mulltupfer Röko-steril, 20x20cm, Gr. 3 (Maimed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland)
- Hautfäden 4.0-Prolene® (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Sprühpflaster BAND-AID (Johnson & Johnson, Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- Pflaster, Leukosilk (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)

4.5.2 Narkose

- 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran), Forene®; (Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Ketaminhydrochlorid 10%, Injektionslösung, Ursotamin®; (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland)
- Xylacinhydrochlorid; Xylacin 2%, Rompun®; (Medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzwickede, Deutschland)
- Anästhesiegerät: Ventilator 711 (Siemens AG, München, Deutschland)
- 1ml-Spritzen
- Kanülen

4.5.3 Röntgen

- Röntgengerät: Mobilett Plus (Siemens AG, München, Deutschland)
- Siremobil ISO-C (Siemens AG, München, Deutschland)
- Filme (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)
- Digital-Cassetten (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)

- Röntgenzahlen
- Pflaster, Leukosilk®; (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)

4.5.4 Schmerztherapie

- Buprenorphinhydrochlorid, Temgesic®; Ampulle á 0,324mg Buprenorphinhydrochlorid = 0,3 mg Buprenorphin (Reckitt Benckiser Healthcare, Großbritannien, Ltd.)
- Gentamycin Augensalbe 0,3%, Wirkstoff Gentamycinsulfat 5g N1 (Medphano Arzneimittel GmbH, Rüdersdorf, Deutschland)
- 1ml-Spritzen

4.5.5 Sonstiges

- Digital Thermometer (Paul Hartmann Ltd., Heywood, Großbritannien)
- Waage, Kilomat-Präzisionswaage Typ TE 6100 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Dexapanthenol, Bepanthen® Augensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland)
- ISANA® Enthaarungscreme (Rossmann, Burgwedel, Deutschland)
- Florena® Creme (Florena Cosmetic GmbH Waldheim, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9% NaCl (Fresenius, Deutschland)
- Filzstift (Edding Nr. 3000) in den Farben schwarz, blau, rot und grün (Edding AG, Ahrensburg, Deutschland)
- Mullkompressen, unsteril (Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Deutschland)

4.6 Operation

4.6.1 Anästhesie

Die Ratten wurden vor der Operation, vor den anschließenden Kontrolluntersuchungen und vor der Euthanasie durch eine Inhalationsanästhesie sediert. Die Tiere wurden hierfür in eine durchsichtige Plastikbox gesetzt. Diese wurde verschlossen und ein

Narkose-Gas-Gemisch wurde eingeleitet (Sauerstoff 0,8ml/min, Lachgas 1,3ml/min, Isofluran 5 Vol.%). Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektionsnarkose mit Ketaminhydrochlorid (60mg/kg) und Xylacinhydrochlorid (4mg/kg) in einem Verhältnis von 1,5:1,2 I.E. Die Operation dauerte durchschnittlich 20-30 Minuten und konnte während der Dauer der Intraperitonealanästhesie von ca. 60 Minuten durchgeführt werden.

4.6.2 Operationstechnik

Zur Vorbereitung der Tiere auf die Operation erfolgten die Rasur des rechten Beines mit einer elektrischen Schermaschine, die anschließende Reinigung mittels Enthaarungscreme und die Desinfektion des gesamten Beines. Zur Identifizierung der Tiere wurden diese mit einem wasserfesten Filzstift nach einem speziellen Schema markiert. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu vermeiden, erfolgte die Applikation von Bepanthen Augensalbe. Um einer Unterkühlung der Tiere während der Operation vorzubeugen, wurde der Operationstisch mit einer Heizdecke ausgelegt, über welche ein steriles Tuch platziert und das Operationsbesteck ausgebreitet wurde.

Der Bildverstärker wurde in Position gebracht und die Detektorfläche mit einem sterilen Tuch abgedeckt. Nach Umlagerung der Tiere auf den Operationstisch erfolgte die Operation unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde eine ca. 5mm lange Hautinzision im Bereich der Patellarsehne durchgeführt. Eine mediane Inzision der Patellarsehne diente als Zugang zum Kniegelenk, anschließend wurde das distale Femur dargestellt. Der Eintrittspunkt des Kirschnerdrahtes zwischen den beiden Femurkondylen konnte nun ertastet und mit Hilfe des Bildverstärkers dargestellt werden. Die Eintrittsstelle wurde mit dem Kirschnerdraht markiert. Unter ständiger Kontrolle mittels Bildverstärker konnte mit dem Handbohrer (\varnothing 1,2mm) die Kortikalis in Richtung Knochenmark durchbohrt und der Markraum durch Einführen des Drahts erweitert werden. Nun konnte das Implantat mit einem Durchmesser von 1,4mm unbeschichtet vs. beschichtet retrograd in das rechte Femur eingebracht werden. Unter Bildkontrolle wurde das Implantat bis zum Trochanter Major vorgeschoben und das distale Implantatende mit Hilfe einer Kneifzange auf Höhe der Kondylen abgetrennt (s. Abb. 3).

Im Anschluss erfolgte die Kontrolle der Implantatlage zentral im Markraum mit dem Bildverstärker in zwei Ebenen, antero-posterior und lateral. Die Wundränder wurden mit

zwei resorbierbaren Hautnähten verschlossen, desinfiziert und mit Sprühflaster und Leukosilktape versehen.

Direkt postoperativ erfolgte unter unsterilen Bedingungen die erneute Lagekontrolle des Implantates durch Röntgen des rechten Femur in den beiden Ebenen, antero-posterior und lateral (s. Kapitel 4.5.3 - Röntgenbilder).

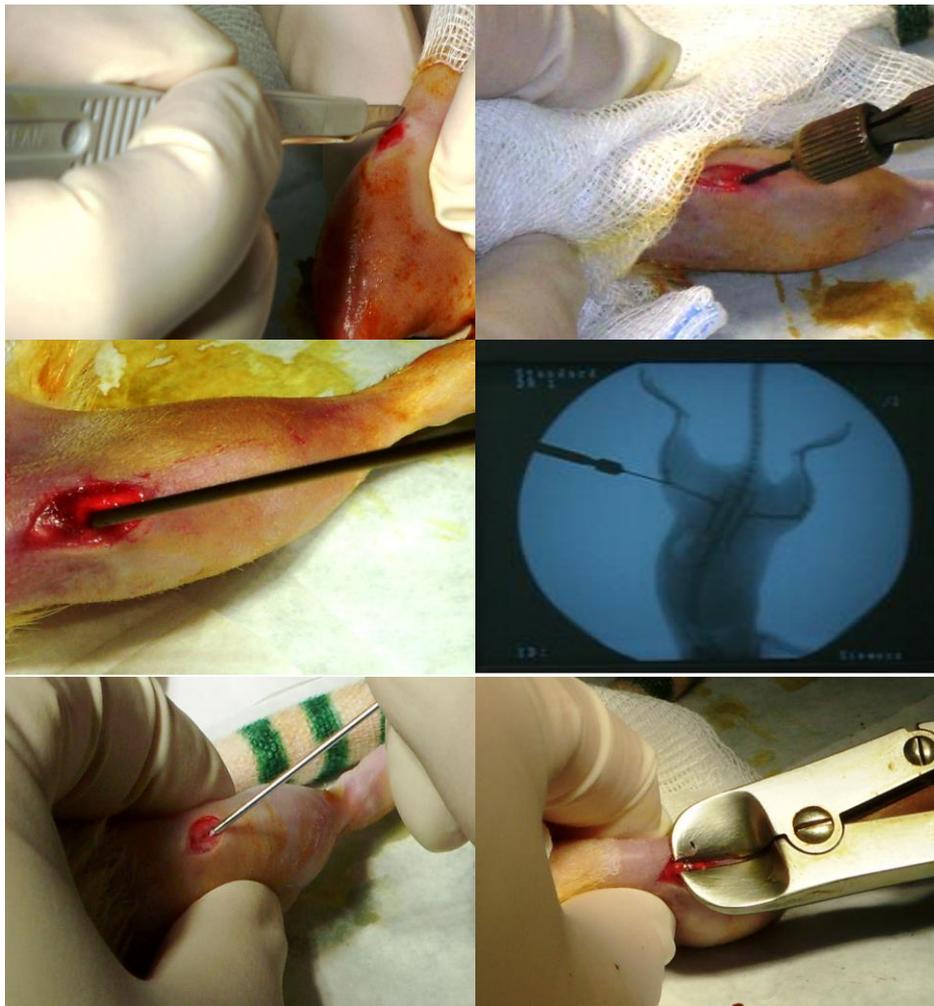


Abb. 3: Operationsschritte

1. Reihe links: Hautinzision, 1. Reihe rechts: Aufbohren Markraum mit Markraumborner;
2. Reihe links: Vorbohren Markraum mit Stahldraht;
2. Reihe rechts: Röntgenkontrolle;
3. Reihe links: Vorschieben K-Draht;
3. Reihe rechts: Kürzen K-Drahtende auf Höhe der Femurkondylen;

4.6.3 Nachsorge

Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in ihre Käfige gebracht und erhielten am 1. und 2. postoperativen Tag eine Schmerzmedikation in Form von Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic) 0,3mg s.c.. Der klinische postoperative Verlauf wurde täglich kontrolliert wobei Wundheilung, Verhalten, Aussehen und Aktivität der Tiere beurteilt wurden.

4.6.4 Röntgenbilder

Die radiologischen Kontrollen der operierten rechten Femora erfolgten jeweils in zwei Ebenen, wobei das Femur jeweils antero-posterior und lateral (s. Abb. 4) geröntgt wurde. Die a.p. Aufnahme erfolgte unter vollständiger Extension des Beines, welches mit Leukosilktape an der Filmkassette fixiert wurde. Zur lateralen Aufnahme wurde das rechte Femur im Hüftgelenk abduziert und außenrotiert. Zur Identifizierung des Tieres wurden Röntgenzahlen auf die Filmkassette gelegt. Das Bild wurde mit einem Film-Fokus-Abstand von 60cm bei einer Strahlenhärte von 52kEV und einer Belichtungszeit von 1,8mAs angefertigt. Durchgeführt wurden die radiologischen Kontrollen im Anschluss an die Operation, sowie am 56. Tag postoperativ vor der Euthanasie.

Die Röntgenbilder wurden systematisch begutachtet, wobei die korrekte und vergleichbare Lage des Implantates zentral im Markraum des Knochens beurteilt wurde. Es wurde auf Lageveränderungen des Implantates in der Markhöhle, Materiallockerung, -bruch und Zeichen von Infektionen bzw. Osteolysen geachtet.



Abb. 4: Röntgenaufnahme rechtes Femur postoperativ in 2 Ebenen

li.: antero-posterior, re.: lateral

4.7 Tötung und Knochenentnahme

4.7.1 Material

- Material Narkose (s. Kapitel Operationsaufbau)
- Kaliumchlorid 7,45%, Injektionslösung B-Braun (Melsungen AG, Meldungen, Deutschland)
- 1ml-Spritzen
- Kanülen
- Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Präparierschere (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Pinzette (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)

4.7.2 Durchführung

Zunächst wurden die Ratten durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran sediert (s. Anästhesie). Im Anschluss erfolgte die intrakardiale Applikation von ca. 1ml 7,45%iger Kaliumchloridlösung. Hierbei handelt es sich um eine kardioplege Lösung, welche zum sofortigen Herzstillstand der Tiere führt. Nach inspektorischer und palpatorischer Verifikation des Todes, wurde anschließend das rechte Femur freipräpariert. Hierfür wurde ein Schnitt am lateralen Oberschenkel gesetzt und der Knochen im Hüft- und Kniegelenk exartikuliert. Es erfolgte die gründliche Entfernung des Weichteilgewebes, unter Schonung von Periost und Knochengewebe.

4.8 Biomechanische Untersuchung

4.8.1 Material

- Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A)
- Einmalmundschutz (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A)
- Kneifzange (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Schiebelehre
- Haltevorrichtung

- Kunststoff Technovit 3040 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Einmalspritze 5ml (B-Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kanüle (B-Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kochenwachs; Ethicon (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A)

4.8.2 Geräte

- Miniaturtrennsäge (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Trennsägeblätter (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Zwick®-Prüfmaschine 1455 (Zwick, Ulm, Deutschland)

4.8.3 Aufbau

Vorbereitung des Knochens und Einbettung

Für die biomechanische Testung wurde das Femur zunächst mit einer Miniaturkreissäge freipräpariert. Auf Höhe des Foramen nutricium wurde hierbei die Kortikalis zirkulär um das Implantat angesägt. Dabei galt es darauf zu achten, das Implantat nicht mit dem Sägeblatt zu berühren, um eine Lockerung oder Dislokation zu vermeiden. Das Knochenmaterial wurde anschließend vom Caput femoris nach distal mit einer flachen Kneifzange vorsichtig abgetragen (s. Abb. 5). Am distalen Femur wurde die Kortikalis ebenfalls zirkulär um das Implantat angesägt. Als Ansatzpunkt diente hier die dorsale Ansatzlinie der Gelenkkapsel. Auch hier wurde anschließend mit der Kneifzange das Knochenmaterial von der Gelenkfläche ausgehend proximal entfernt. Da sich die Foramina nutricia bei den Knochen auf unterschiedlicher Höhe befinden, wurden die einzelnen Knochen nach Absägen der beiden Enden mit der Schiebelehre ausgemessen und die Länge in die Messungen integriert.



Abb. 5: Femur nach Sägen

Das präparierte Femur wurde in eine speziell hergestellte Einbettvorrichtung, bestehend aus vier Einzelteilen, platziert. Die Einbettvorrichtung sollte ein reibungsfreies Herausgleiten des Implantates aus dem Knochen während der biomechanischen Testung gewährleisten. Das Implantat wurde dabei so platziert, dass es lotrecht zur einwirkenden Kraft in der Haltevorrichtung stand. Dies diente der Vermeidung seitlicher Biegunskräfte und somit Ungenauigkeiten beim Messvorgang. Zur Positionierung des Knochens musste die Einbettvorrichtung in ihre Einzelteile, Bodenplatte, Deckplatte, Mittelstück und Hülse, (s. Abb. 6) zerlegt werden. Die Spitze des Implantates wurde in das Loch der Bodenplatte gesetzt und der korrekte Sitz durch Abdichtung des Knochens mit Knochenwachs sichergestellt. Anschließend wurde das Mittelstück aufgesetzt. In das Lumen des Mittelstückes wurde mithilfe einer Spritze 2ml des flüssigen Technovit-Kunststoffes appliziert. Hierbei galt es darauf zu achten, dass kein Kunststoff an die Knochen-Implantat-Grenze heran reichte, um das Herausgleiten des Implantates während der Testung nicht zu manipulieren.

Zur senkrechten Positionierung des Implantats in der Einbettvorrichtung wurde eine Hülse und anschließend eine Deckplatte auf das Ende des Implantates gesetzt.

Nach Aushärten des Kunststoffes wurden Deckplatte und Hülse entfernt. Durch ein Loch in der Bodenplatte wurde ein reibungsfreies Herausgleiten des Implantates aus dem Knochen im Push-Out Versuch mit der Zwick®-Prüfmaschine gewährleistet. Ein Schema der Einbettvorrichtung ist in Abb. 6 zu sehen (104).

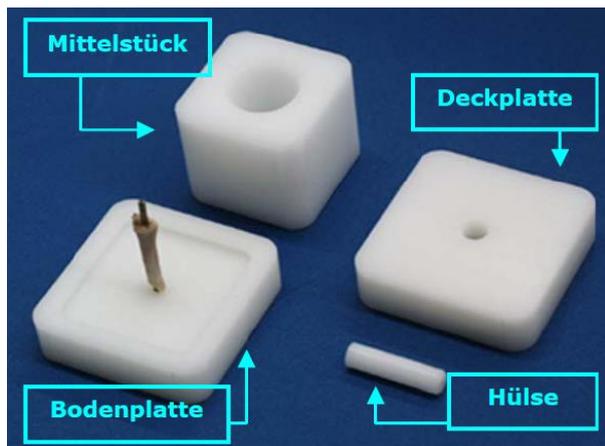


Abb. 6: Schema Einbettvorrichtung Biomechanik (104)

4.8.4 Durchführung

Die Push-Out Testung erfolgte mit der Zwick®-Prüfmaschine. Der Aufbau der Maschine bestand aus einem Zylinder (a), einem Stempel (b), der mit einer definierten Geschwindigkeit auf den Zylinder herangefahren wurde und einer Kraftmessdose (c), welche die auf den Stempel einwirkende Kraft messen sollte und welche bei einer definierten maximalen Kraft den Versuch beendete (s. Abb. 7). Die Zwick®-Prüfmaschine war mit einem Computer verbunden, der die erhobenen Messdaten verarbeitete, speicherte und graphisch darstellte.

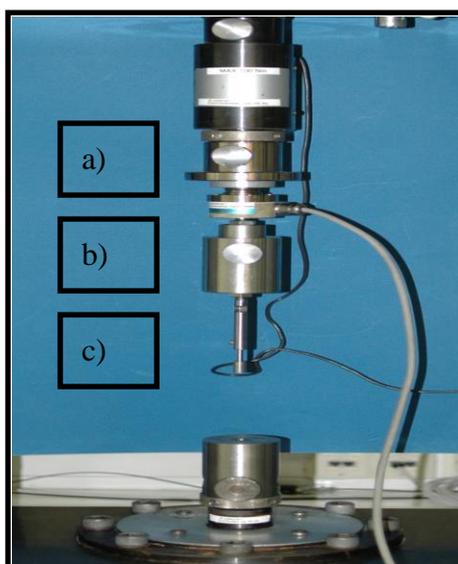


Abb. 7: Zwick®-Prüfmaschine für den Push-Out-Test.

a = Zylinder, b) = Stempel, c) = Kraftmessdose.

Die Haltevorrichtung mit dem eingebetteten Knochen wurde vor der Messung auf den Zylinder platziert. Die Platzierung dort erfolgte so, dass der von oben mit einer definierten Geschwindigkeit herabgleitende Stempel direkt auf das Implantat zeigte. Nach Beginn der Messung drückte der Stempel das Implantat aus dem Knochen heraus. Die dabei aufgewendete Kraft in Newton [N] wurde von der Kraftmessdose gemessen. Der Computer zeigte zeitgleich die Laufweite des Stempels und die auf das Implantat einwirkende Kraft in Form einer Kurve auf dem Monitor an (s. Abb. 8). Die Daten wurden als Rohdaten gespeichert. Die Messung wurde automatisch beendet nachdem das Implantat 2mm aus dem Knochen herausgedrückt worden war.

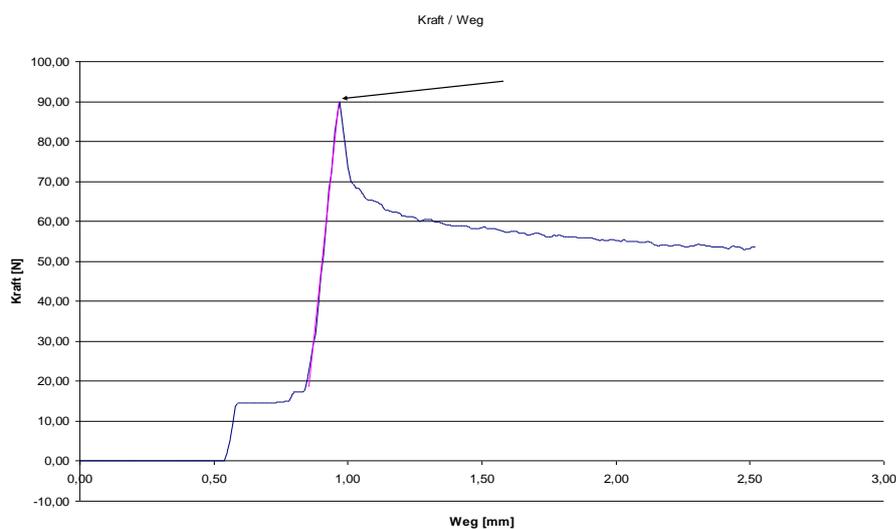


Abb. 8: Messkurve Push-Out Test

4.8.5 Auswertung

Fixierungskraft

Ziel der biomechanischen Testung war es, die Implantate der unterschiedlichen Versuchsgruppen hinsichtlich der Stabilität ihres Sitzes im Markraum des Knochens zu untersuchen. Als Parameter hierfür diente bei der biomechanischen Testung zunächst die Kraft des initialen Push-Out mit der Einheit N. Als initialer Push-Out wurde dabei die Kraft benannt, die aufgebracht werden musste, um das Implantat erstmalig aus der ursprünglichen Position im Knochen zu bewegen. Aus dem initialen Push-Out wurde anschließend die Fixierungskraft durch Einbeziehen der Knochenlänge berechnet. Die Kraft für den initialen Push-Out wurde hierfür durch die Knochen-Implantat-Kontaktfläche A [mm²] dividiert. So wurde der individuellen Knochenlänge Rechnung

getragen, da diese als „Höhe“ in die Berechnung der Kontaktfläche mit einging (Formel s. unten).

Knochen-Implantat Kontaktfläche

Die Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Mantelfläche Zylinder } A \text{ [mm}^2\text{]} = 2 \times \text{Radius } r \text{ [mm]} \times \text{Höhe } h \text{ [mm]}$$

Der Radius r entspricht dabei der Hälfte des Implantatdurchmessers, 0,7mm, und die Höhe h ist die zuvor gemessenen Knochenlänge.

Die Formel zur Berechnung der Fixierungskraft = Strength of Fixation P [Mpa]:

$$\text{Fixierungskraft } P \text{ [Mpa]} = \frac{\text{Kraft für initialen Push-Out FIP [N]}}{\text{Kontaktfläche Knochen-Implantat } A \text{ [mm}^2\text{]}}$$

Für die unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden aus den gemessenen Fixierungskräften die arithmetischen Mittelwerte gebildet, die nach statistischer Kontrolle einander gegenübergestellt wurden.

4.9 Histologische Untersuchung

4.9.1 Material

- Fixierlösung (10% normalgepuffertes Formaldehyd)
- Alkohol 70%, 80%, 96%, 100% (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland)
- Petrolbenzin (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette (Sakura Inc., Torrance, USA)
- Kunststoff Technovit 7200 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)

- Fixationskleber Technovit 7230 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Technovit 4000, 3-Komponentenkleber (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Präzisionskleber Technovit 7210 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Einmalskalpell No.15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Glasgefäße mit Deckel
- Aluminiumfolie
- Plastikeinbettform
- Medizingläser
- Rührspatel
- Kunststoffobjekträger (Walter Messner GmbH, Oststeinbeck, Deutschland)
- Deckgläser (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Schleifpapier 500, 800, 1000, 1200, 2000, 4000 Körnung

4.9.2 Geräte

- Schleifmaschine (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Mikro-Schleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Digitales Mikrometer-Feinmessgerät (Mitutoyo America Corporation, Aurora, U.S.A.)
- Proxxon Miniaturtrennsäge (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Schüttler, HS 501 digital (KIKA Labortechnik)
- Licht-Polymerisationsgerät (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Brutschrank 37°C (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Bandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Vakuumpresse (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Mikroskop (Leica DM-RB, Bensheim, Germany)

-
- Software (KS 400, Zeiss, Deutschland)
 - Bildbearbeitungssoftware (Mosaix Software)
 - Zeiss Objektträger mit Maßstab (Zeiss, Deutschland)

4.9.3 Durchführung

Die Fixierung der Knochen für die histologische Auswertung erfolgte direkt im Anschluss an die Tötung. Der Knochen wurde entnommen und das Weichteilgewebe gründlich entfernt. Das Femur wurde am proximalen Ende auf Höhe des Foramen nutricium kreisförmig um das Implantat abgesägt. So wurde das Eindringen von Fixierlösung in den Knochen-Implantat-Spalt und eine Stabilisierung des Implantates im Markraum bei der späteren Einbettung gewährleistet. Im Anschluss erfolgte die dreitägige Fixierung der Knochen. Dazu wurden die Präparate in markierten Plastikkassetten in ein luftdichtes und lichtgeschütztes Glas mit Formaldehyd als Fixierlösung gegeben. Mit Hilfe eines Schüttlers wurde das Eindringen der Lösung in das Gewebe unterstützt. Im Anschluss an die Fixierung erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wobei die Präparate jeweils für drei Tage in dafür vorgesehenen Behältern mit 70%, 80%, 96% und 3x 100% Ethanol verblieben. Auch hierbei wurden die Behältnisse auf dem Schüttler platziert. Die aufsteigende Alkoholreihe diente dem Entgegenwirken des Schrumpfens und Zerreißens der Präparate. Anschließend wurden die Präparate zur Entfettung und Vorbereitung für die Infiltration für einen Tag in Xylol eingelegt.

Die Infiltration erfolgte mit dem flüssigen Kunststoff, Technovit 7200, einem Kunststoff auf Methylmetacrylat-Basis, unter Lichtausschluss für zwei mal vier Tage bei 4°Celsius, da diese Temperatur eine Polymerisierung des Kunststoffs verhinderte.

Einbettung des Knochens/ Polymerisation

Zur Einbettung der Knochen wurden diese in eine ovale Einbettform gelegt und mit Fixationskleber (Technovit 7230) fixiert. Der Kunststoff (Technovit 7200) wurde in die Form gegossen und für eine Dauer von 8 Stunden wurde die Einbettform in ein Licht-Polymerisationsgerät (Exakt) gestellt, wo der Kunststoff aushärtete. Anschließend wurden die Präparate in einen 37°C Brutschrank verbracht, in welchem die dem Präparat aufliegende Filmschicht beseitigt wurde. Luftsauerstoff verhindert die

Polymerisation an der Oberfläche der Einbettform, wodurch sich diese Filmschicht auf der Oberfläche der Präparate bildete.

Schleifen des Präparates

Ziel der histologischen Untersuchung des Knochens war die Beurteilung des direkten und indirekten Knochen-Implantat-Kontaktes an einem Längsschnitt bei einliegendem Implantat. Die Darstellung bei noch einliegendem, erhaltenem Implantat sollte eine unbeeinträchtigte Beurteilung des Knochen-Implantat-Kontaktes ermöglichen. Bei herausgelöstem Implantat könnten schrumpfungsbedingte Artefakte oder eventuell abgetrennte Knochentrabekel die Beurteilung erschweren und ungenau machen. Für die histologische Fragestellung wurden daher Längsschnitte der Knochen benötigt.

Für die Herstellung wurden die Präparate zunächst mit Petrolbenzin von Schmutz- und Fettrückständen befreit und mit 3-Komponenten-Kleber auf einem Objektträger aufgeklebt. Der Objektträger wurde zuvor mit einem Mikro-Schleifsystem ca. vier Minuten mit 1200er Schleifpapier angeschliffen, um die Haftfläche anzurauen und die Haftung dadurch zu verbessern. Das Präparat wurde dann mit dem Objektträger auf dem Boden einer Vakuumpresse platziert und dort durch das Vakuum festgehalten. Nach 10 Minuten in dieser Position war der Kleber ausgehärtet und das Präparat auf dem Objektträger fixiert. Der Objektträger konnte nun in das Mikro-Schleifsystem eingesetzt werden. Das Präparat wurde dann mit feinem Schleifpapier (1000er, 1200er) angeschliffen bis das Implantat in seiner vollen Länge und dem ganzen Durchmesser zu sehen war.

Fixierung des Präparats zwischen zwei Objektträgern –

Herstellung des sog. Sandwichs

Bei der Herstellung des Sandwichs wurde ein Messprotokoll geführt (s. Abb. 9). Nach erneuter Reinigung des Präparates mit Petrolbenzin wurde die Dicke mit Hilfe eines Handmessgerätes ausgemessen. Dieser Wert ging als 1. Messwert in das Messprotokoll ein. Ein zweiter Objektträger wurde entsprechend der üblichen Vorgehensweise angeschliffen und anschließend mit Petrolbenzin gereinigt. Der Objektträger wurde ebenfalls in seiner Dicke ausgemessen und der Messwert ging als 2. Messung in das Messprotokoll ein.

Der zweite Objektträger wurde in die Präzisionsklebepresse eingelegt und dort durch die Vakuumpumpe fixiert. Das angeschliffene Präparat wurde mit dem Präzisionskleber

Technovit 7210 versehen und auf den unteren Teil der Präzisionsklebepresse positioniert und an den zweiten Objektträger gepresst.

Nach 12 Minuten in dieser Position war der Kleber ausgehärtet und das Präparat auf beiden Objektträgern fixiert, das Sandwich wurde entnommen und die Dicke ausgemessen. Die Ergebnisse dieser Messung gingen als 3. Messung in das Messprotokoll ein. Die Dicke der Klebeschicht zwischen Präparat und Objektträger wurde ermittelt, indem die Werte aus der 1. und 2. Messung addiert und anschließend von dem Wert der 3. Messung subtrahiert wurden. Dies war erforderlich, um die korrekte Dicke des Implantatschliffes beurteilen zu können. Nun wurde das Sandwich gesägt. Hierzu wurde es mit der angeschliffenen Seite an der Vakuumplatte der Bandsäge arretiert und ein ca. 300µm dicker Schnitt wurde hergestellt. Bei diesem Vorgang galt es besonders vorsichtig vorzugehen, um das Implantat nicht in seiner Position im Knochen zu irritieren und gegebenenfalls heraus zu reißen.

Feinschleifen des gesägten Präparates

Ziel des Feinschleifens der Präparate war es, die Präparate mit dem Mikro-Schleifsystem auf eine Dicke von 90µm herunter zu schleifen. Vor dem Feinschleifen musste von jedem Präparat die Klebeschicht abgezogen werden, um die eigentliche Präparatdicke zu erhalten. Die Zielstärke wurde dann mit dem im Schleifsystem integrierten Messsystem kontrolliert und manuell mit einem digitalen Mikrometer-Feinmessgerät nachgemessen.

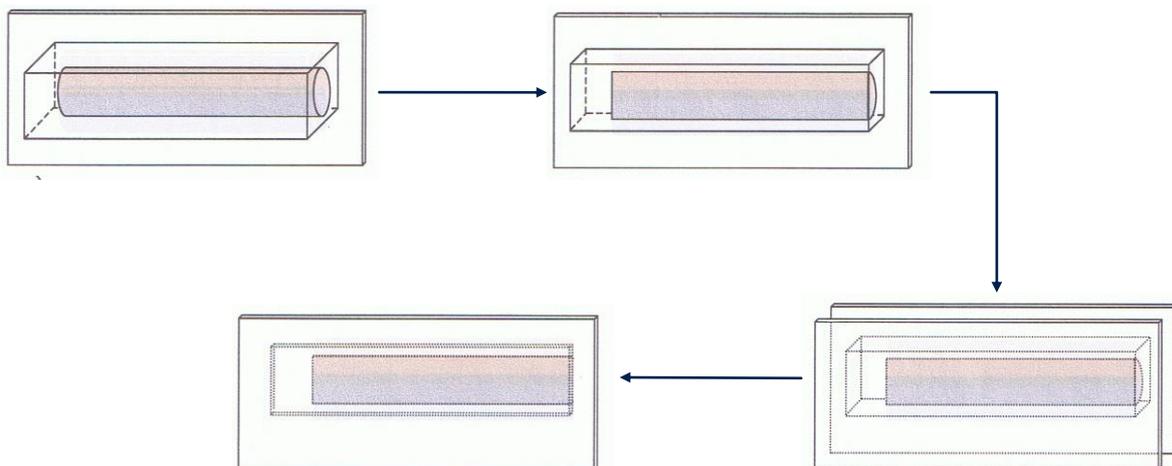


Abb. 9: Herstellung Präparate

Färben des Präparates

Im Anschluss an den Schleifvorgang erfolgte das Anfärben der Schliffe, um diese mikroskopisch beurteilbar zu machen. Für die Präparate wurde die Kombinationsfärbung von Kossa/Safranin O verwendet, mit welcher die Darstellung von Knochen und Knorpelgewebe möglich ist. Das Färben der Präparate erfolgte nach einem minutiösen Schema, welches in Tab. 4 dargestellt ist.

	Arbeitsschritt	Zeit
1	Schnitte Ansäuern in Ameisensäure 1% (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	1 min
2	Spülen in Aqua dest. (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)	2x
3	Färben in 3 %iger Silbernitratlösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	8 min
4	Spülen in Aqua dest.	3x
5	Reduzieren in Natrium Formaldehydlösung Natrium: (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) Formaldehyd: (J.T. Baker, Deventer, Holland)	2 min
6	Wässern in Leitungswasser	10 min
7	Natriumthiosulfat 5% (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	5 min
8	Wässern in Leitungswasser	10 min
9	Spülen in Aqua dest.	30 sek
10	Färben in Safranin O (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)	10 min
11	Spülen in Aqua dest.	30 sek
12	Entwässern: 1. 96 % Alkohol 2. 100 % Alkohol (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)	2x 2x
13	Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland)	2x 5 min
14	Eindeckeln mit Vitroclud (R.Langensbrinck, Emmendingen, Deutschland)	

Tab. 4: Färbeanleitung (nach (104))

Die Anfärbung der unterschiedlichen Gewebe erfolgte wie folgt:

• Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe	schwarz
• Mineralisationsfronten	schwarz
• Granulierter Hyaliner Knorpel	rot
• Nicht mineralisierter Knochen	rot

Analyse der Präparate

Da die Auswertung der histologischen Präparate am Computer erfolgte, war es nötig, die Präparate zunächst mithilfe eines Bildanalyse-Systems digital aufzunehmen. Die Präparate wurden an einem Mikroskop mit 10facher Vergrößerung mit einem motorisierten Kreuztisch durch eine spezielle Software in einen Computer eingelesen. Jedes eingelesene Bild bestand aus ca. 200 Einzelbildern, welche durch eine spezielle Software aneinandergesetzt und zu einem Einzelbild verarbeitet wurden. Ein spezieller Objektträger mit einer geeichten Mikrometerskala diente als Maßstab.

4.9.4 Auswertung

Ziel der histologischen Auswertung war die Beurteilung der Einheilung des Implantates in den Knochen. Anschließend wurde diese sog. Implantatintegration in den unterschiedlichen Gruppen verglichen.

Die Präparate wurden zunächst histomorphometrisch gegenübergestellt. Anschließend wurde die Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen in einer definierten „Region of Interest“ (ROI) ausgemessen (s. Abb. 10). Die ROI wurde so gewählt, dass der Bereich der Präparate, in dem die Kontaktstellen ausgemessen wurden, jeweils im Bereich der Diaphyse des Knochens lag. Die Epiphysen bestehen aus einer sehr unregelmäßigen Spongiosastruktur und sind daher für eine Auswertung ungeeignet.

Diese ROI erstreckte sich von dem Ende des Knochens, an dem die Spitze des Implantates nach Resektion des proximalen Knochenanteils heraus ragte, über eine Strecke von 13,7mm in Richtung Epiphyse.

Die Länge der ROI (3000 Einheiten) betrug 13,7mm und die Gesamtstrecke somit $2 \times 13,7\text{mm} = 27,4\text{mm}$, da die Kontaktstellen jeweils an oberem und unterem Implantatanteil ausgemessen wurden.

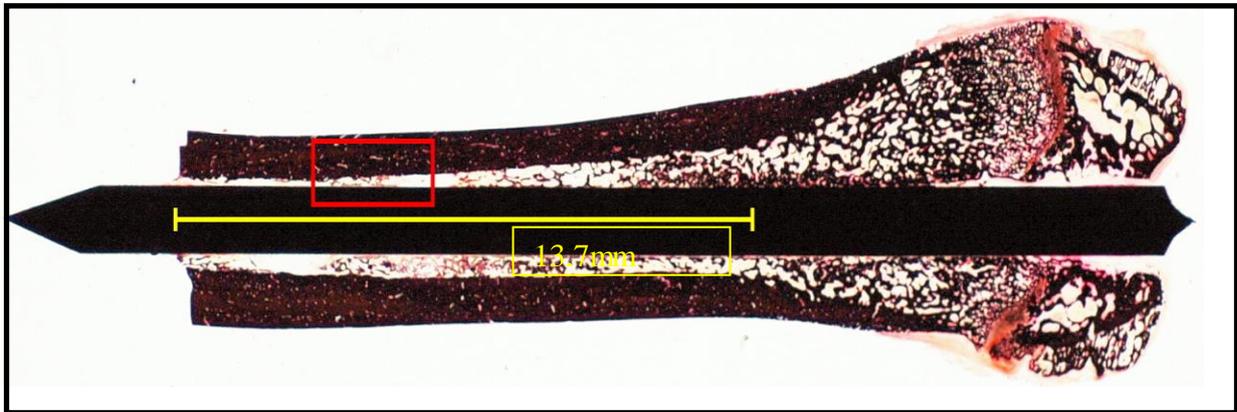


Abb. 10: Längsschnitt Präparat mit einliegendem Implantat. Darstellung der Region of Interest (ROI = 13,7mm vom Knochenende in Richtung Epiphyse ziehend)

Die histologische Auswertung umfasste die Ausmessung der Knochen-Implantat-Kontaktflächen, direkt und indirekt und die Ausmessung der Knochensubstanz in der sog. Bone Area. Als direkter Knochen-Implantatkontakt wurde jeglicher direkter Kontakt zwischen Implantat und Knochen gewertet. Die Messung des indirekten Knochen-Implantatkontaktes bezog Abstände bis maximal 0,2mm zwischen Knochen und Implantat mit ein.

Zusätzlich zur Bestimmung des direkten und indirekten Knochen-Implantatkontaktes erfolgte die Ausmessung der Knochensubstanz in einer zweiten ROI, der sog. Bone Area. Als Bone Area wurde ein Bereich, ausgehend von dem Rand des Implantates in Richtung Kortikalis von 0,3mm Breite definiert (s. Abb. 11). In diesem Bereich wurden die Knochen trabekel mithilfe einer speziellen Software ausgemessen und in mm^2 als Bone Area abgegeben.

Die Messung der Kontaktflächen erfolgte mit dem Computerprogramm Axiovision der Firma Zeiss. Die direkten und indirekten Knochen-Implantat Kontakte wurden jeweils mit einer entsprechenden farbigen Linie in ihrer vollständigen Ausdehnung gekennzeichnet. Die Länge der Linien wurde von dem Computersystem (Axiovision) in mm gemessen (s. Abb. 11). Die Werte wurden addiert zu einer Gesamtlänge in mm und für jedes Präparat separat gespeichert (s. Abb. 12). Die Umrechnung der Einheiten in

Millimeter wurde durch einen Referenzobjektträger, auf welchem eine definierte Strecke von einem Millimeter eingezeichnet war, ermöglicht.

Zu Beginn der Messung wurde bei den digitalisierten Präparaten jeweils der Implantatdurchmesser ausgemessen und verglichen, um sicher zu gehen, dass alle Präparate in der gleichen Ebene getroffen wurden. Dies wurde bereits im Vorhinein durch die systematisierte Technik des Einbettens, Schneidens und Schleifens verfolgt.

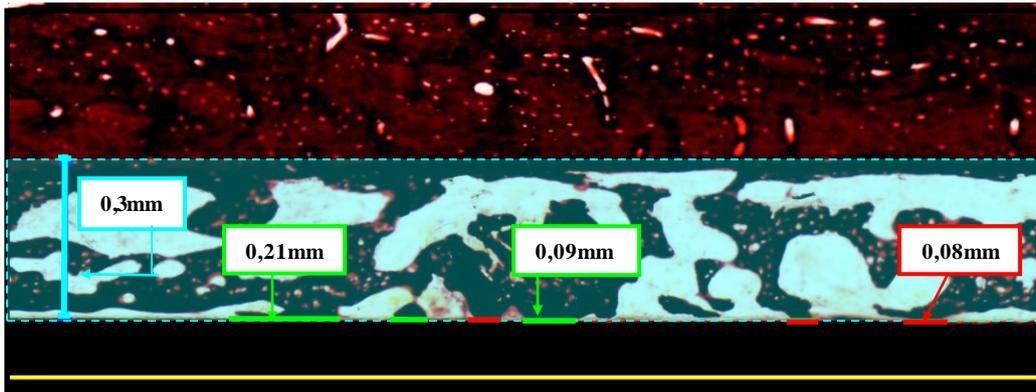


Abb. 11: Darstellung Messung der direkten und indirekten Knochen-Implantatkontakte (Grün = direkte Knochen-Implantatkontakte, rot = indirekte Knochen-Implantatkontakte, blau = Bone Area (ROI))

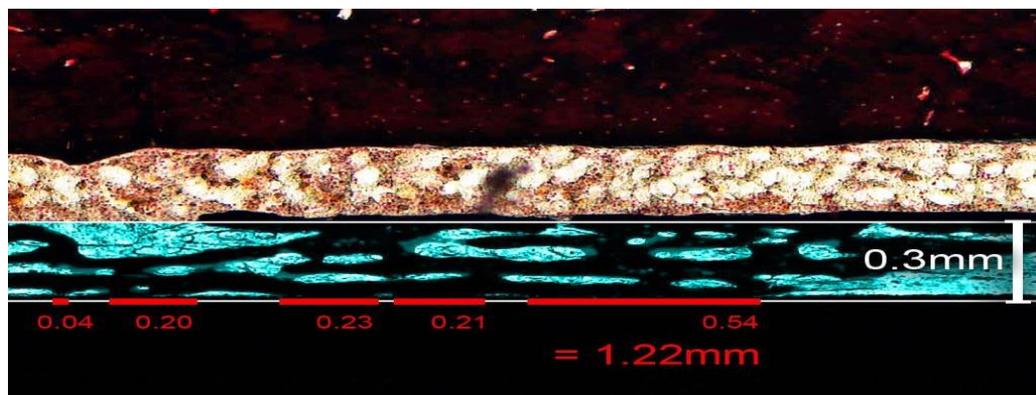


Abb. 12: Darstellung Messung der direkten Knochen-Implantatkontakte (inklusive Addieren der Einzellängen zu Gesamtlänge in mm (Rot))

Für alle Gruppen wurden jeweils die Gesamtlängen der direkten und indirekten Knochen-Implantatkontakte und die Bone Area ausgemessen und in Millimeter angegeben. Für jede Gruppe wurde ein arithmetischer Mittelwert der Gesamtlängen der Kontaktstellen erstellt und die Werte aller Gruppen statistisch verglichen.

4.10 Statistik

Die Ergebnisse der biomechanischen und histologischen Testungen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und der Bonferroni-Korrektur bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ auf ihre statistische Signifikanz geprüft.

Zusätzlich wurde zur Untersuchung der Unterschiede zwischen jeweils zwei Versuchsgruppen der Mann-Whitney-Test angewendet.

Mit diesen beiden statistischen Tests war es möglich, Unterschiede innerhalb aller Versuchsgruppen sowie zwischen jeweils zwei definierten Versuchsgruppen zu untersuchen.

Es wurde die Statistiksoftware SPSS (14.0 SPSS Inc. Chicago, USA) zur Berechnung der statistischen Daten verwendet.

5 Ergebnisse

Die Operation wurde von den Tieren gut toleriert. Die im Verlauf gemessene Temperatur und das Gewicht zeigten konstante Werte. Zwei Tiere starben während der Versuche. Ein Tier verstarb unter der Narkose, ein weiteres im postoperativen Verlauf, wobei die Ursache nicht geklärt werden konnte. Beide Tiere wurden aus der histologischen Auswertung genommen, so dass in der histologischen Kontrollgruppe acht Tiere zur Verfügung standen.

Bei drei Tieren aus der Gruppe Simvastatin High wurden radiologisch hypertrophe Knochen mit Osteolysen dargestellt. Die hier durchgeführten mikrobiologischen Abstriche zum Nachweis einer Infektion waren negativ. Die betroffenen Tiere aus der Gruppe SIM High wurden der histologischen Auswertung zugeführt.

5.1 Ergebnisse Röntgen

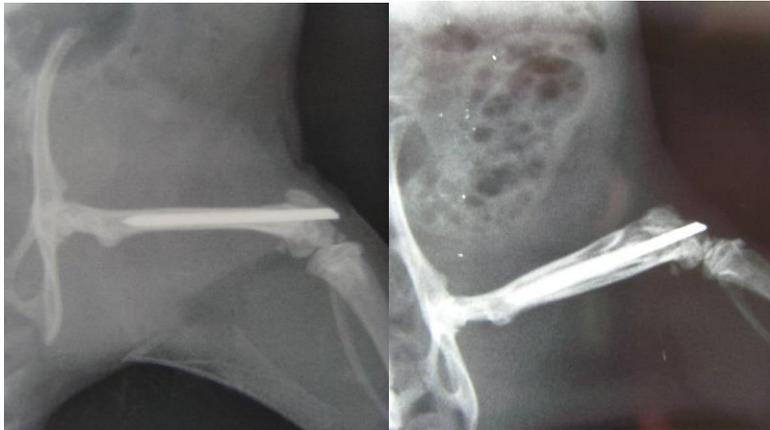
Von jedem Tier wurde jeweils am Tag der Operation, sowie an Tag 56, dem Tag der Euthanasie, eine antero-posteriore und laterale Röntgenaufnahme des rechten Femur erstellt (s. Abb. 4, Kap. Material und Methoden).

Die Auswertung der Röntgenbilder erfolgte in Form einer klinisch deskriptiven Beurteilung der Knochen-Implantatintegration in Bezug auf die Lokalisation, Dislokation, Lockerung oder Bruch des Implantates, Frakturen und Osteolysen.

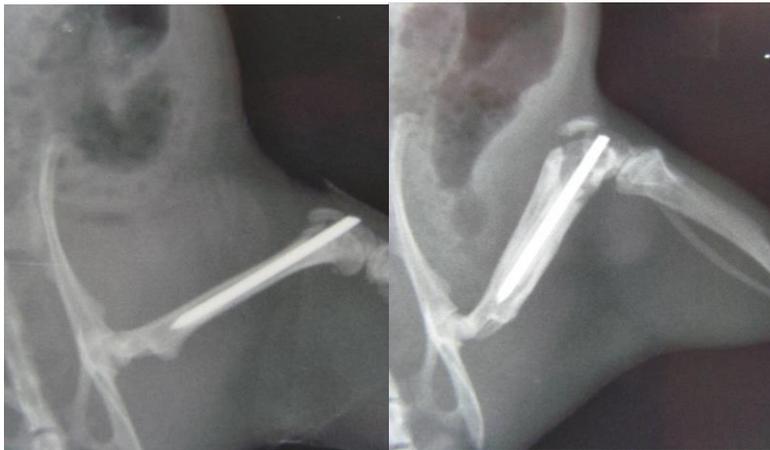
Im Rahmen der radiologischen Kontrollen konnte bei allen Tieren eine vergleichbare intramedulläre Positionierung des Implantates im Femur nachgewiesen werden.

Bei drei Tieren aus der SIM High Gruppe zeigten sich in der Röntgenkontrolle an Tag 56 hypertrophe Reaktionen bzw. Osteolysen (s. Abb. 14). Im Rahmen der unmittelbar postoperativ angefertigten Röntgenbilder des rechten Femur in 2 Ebenen war bei den betroffenen Tieren ein regelhafter intramedullärer Sitz der Implantate im Markraum des Femur zu sehen. In den Röntgenaufnahmen vom 56. postoperativen Tag zeigten sich bei nach wie vor intramedullärer Lage des Implantates ohne Dislokation oder Bruch eine hypertrophe, osteolytische Knochenreaktion mit an das Implantat angrenzendem Resorptionssaum. Abb. 13 zeigt die Röntgenbilder der betroffenen Femora mit den Tiernummern 31, 37 und 38 aus der Gruppe SIM High unmittelbar postoperativ, sowie an Tag 56.

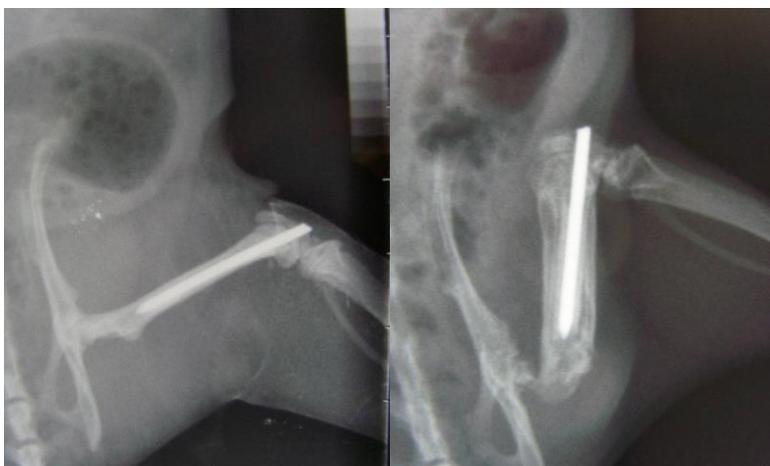
Die radiologisch dargestellte Knochenreaktion ließ sich auch makroskopisch abbilden, wie in Abbildung 14 des Tieres mit der Nummer 38 zu sehen ist (s. Abb. 14). Aufgrund des Verdachtes auf eine intramedulläre Infektion erfolgte die Entnahme von mikrobiologischen Abstrichen der betroffenen Femora unter sterilen Bedingungen. Die mikrobiologische Auswertung ergab keinen Keimnachweis, die Abstriche waren negativ.



TNR 31



TNR 37



TNR 38

Abb. 13: Röntgen Femur lateral präoperativ & postoperativ der Tiernr. 31, 37 & 38

aus der Gruppe SIM High Links: Röntgen Femur rechts a.p. postoperativ: korrekter intramedullärer Sitz des Implantates; Rechts: Röntgen Femur rechts a.p. 56. Tag postoperativ: hypertropher Knochen mit Osteolyse und Resorptionssaum

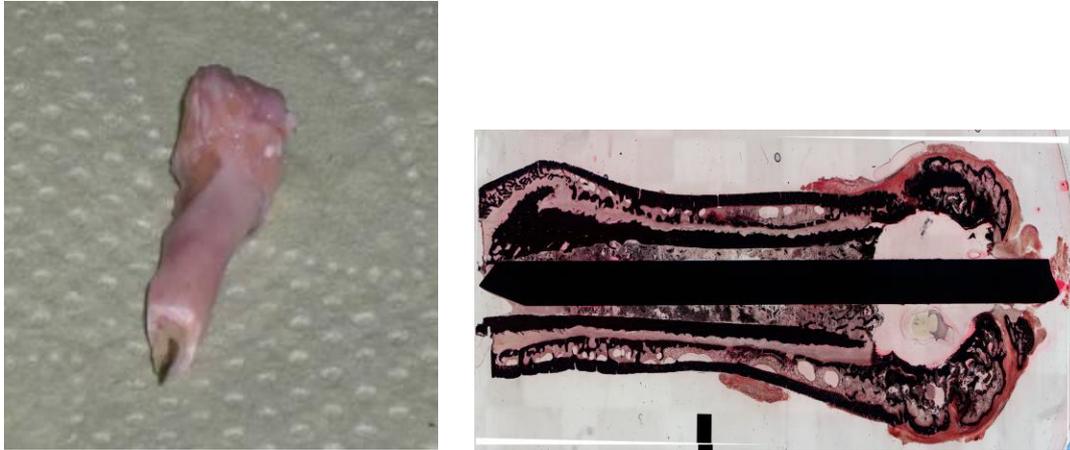


Abb. 14: Rechtes Femur Tier Nummer 38 aus der Gruppe SIM High makroskopisch (links), sowie histologisch (rechts): Hypertropher, osteolytischer Knochen mit regelhaft intramedullär einliegendem K-Draht

Die Ergebnisse der radiologischen Auswertung wurden mit den Ergebnissen der histomorphometrischen und biomechanischen Auswertung verglichen, eine statistische Auswertung erfolgte nicht.

5.2 Ergebnisse Biomechanik

Zur Beurteilung der Implantatintegration und somit der Stabilität des Implantates in den Rattenfemora erfolgte mithilfe der Zwick®-Prüfmaschine die Messung des initialen Push-Out (N) als Kraft, welche aufgebracht werden musste, um das Implantat aus seiner ursprünglichen intramedullären Position im Markraum des rechten Femur heraus zu bewegen. Aus dem Wert für den initialen Push-Out erfolgte die Berechnung der Fixierungskraft (Mpa), welche die individuelle Knochenlänge berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte durch Dividieren des Wertes für den initialen Push-Out durch die jeweilige Knochen-Implantat-Kontaktfläche (s. Kap. Material & Methoden).

Initialer Push-Out

Die initialen Push-Out-Kräfte zeigten innerhalb der unterschiedlichen Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Fixierungskraft

Die Fixierungskraft war signifikant niedriger in der SIM High Gruppe gegenüber beiden Kontrollgruppen (s. Abb. 15).

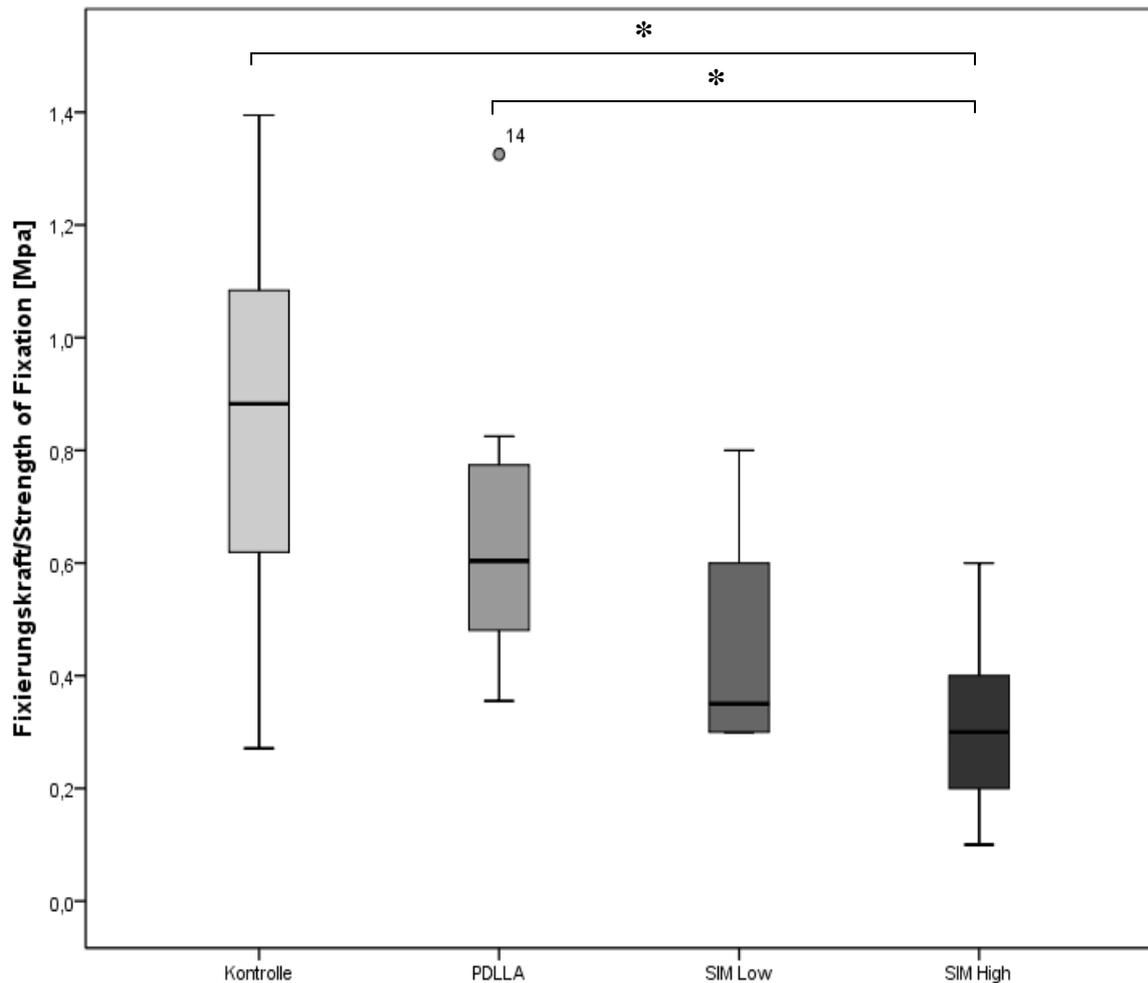


Abb.15: Biomechanische Ergebnisse der Fixierungskraft [Mpa] nach 56 Tagen Standzeit (* $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Bonferroni-Holm-Korrektur)).

Mittelwerte und Standardabweichungen Biomechanik

Gruppe		Initialer Push-Out [N]	Fixierungskraft [Mpa]
Kontrolle	Mittelwert	91,2	8,9
	Standardabweichung	40,1	3,6
PDLLA	Mittelwert	68,7	6,9
	Standardabweichung	34,7	3,3
SIM High	Mittelwert	23,5	2,7
	Standardabweichung	14,3	1,7
SIM Low	Mittelwert	38,1	3,9
	Standardabweichung	13,6	1,5

Tab. 5: Mittelwerte & Standardabweichung initialer Push-Out und Fixierungskraft/
Strength of Fixation

5.3 Ergebnisse Histologie

Gesamter Knochen-Implantat-Kontakt

Die Messung des gesamten Knochen-Implantat Kontaktes ergab signifikant geringere Knochen-Implantat Kontakte in der SIM High Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen ohne Beschichtung sowie der PDLLA-Gruppe (s. Abb. 16).

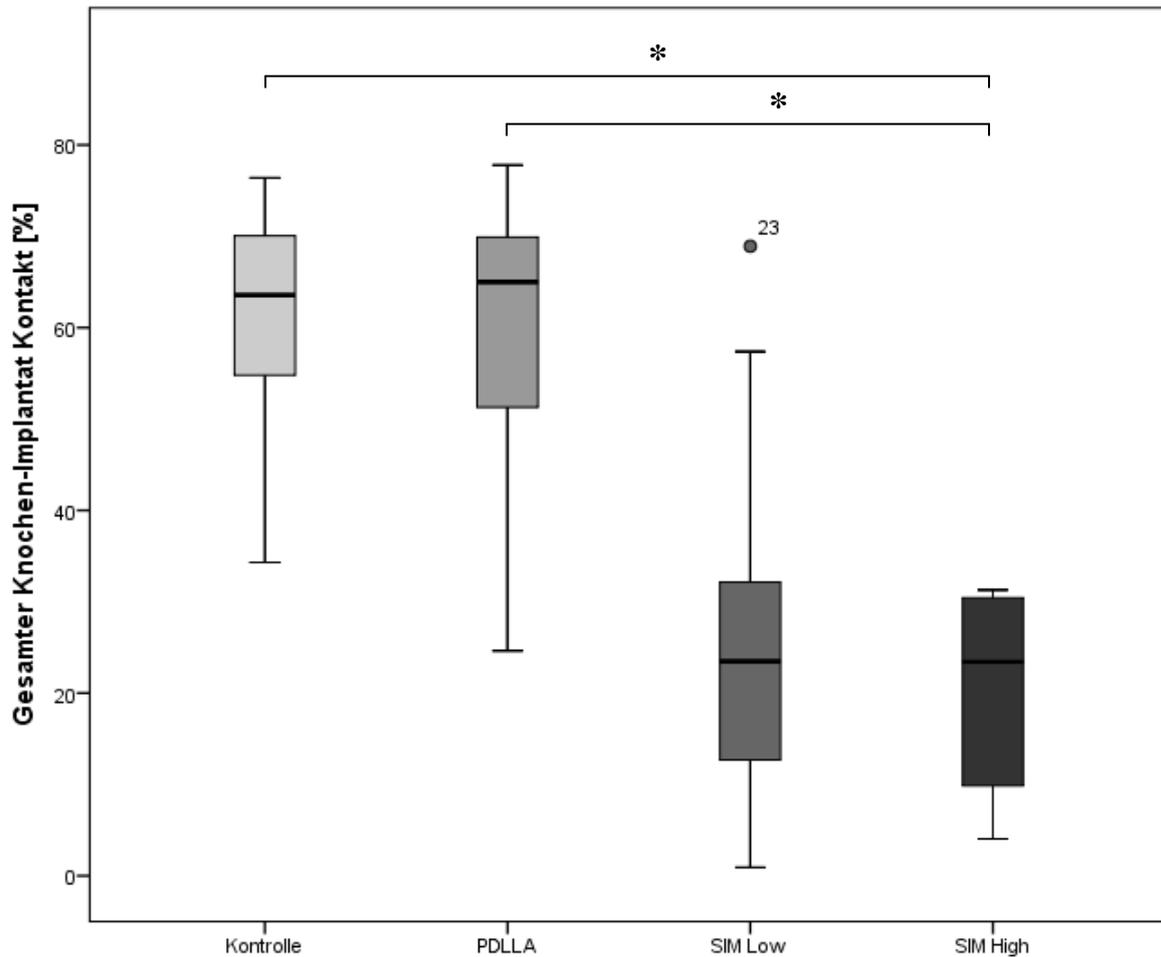


Abb. 16: Histologisches Ergebnis des gesamten Knochen-Implantat Kontaktes.

Direkter Knochen-Implantat Kontakt

Bei der histologischen Auswertung des direkten Knochen-Implantatkontaktes zeigte sich ein signifikant geringerer Knochen-Implantat-Kontakt in der SIM High Gruppe gegenüber der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe (s. Abb. 17).

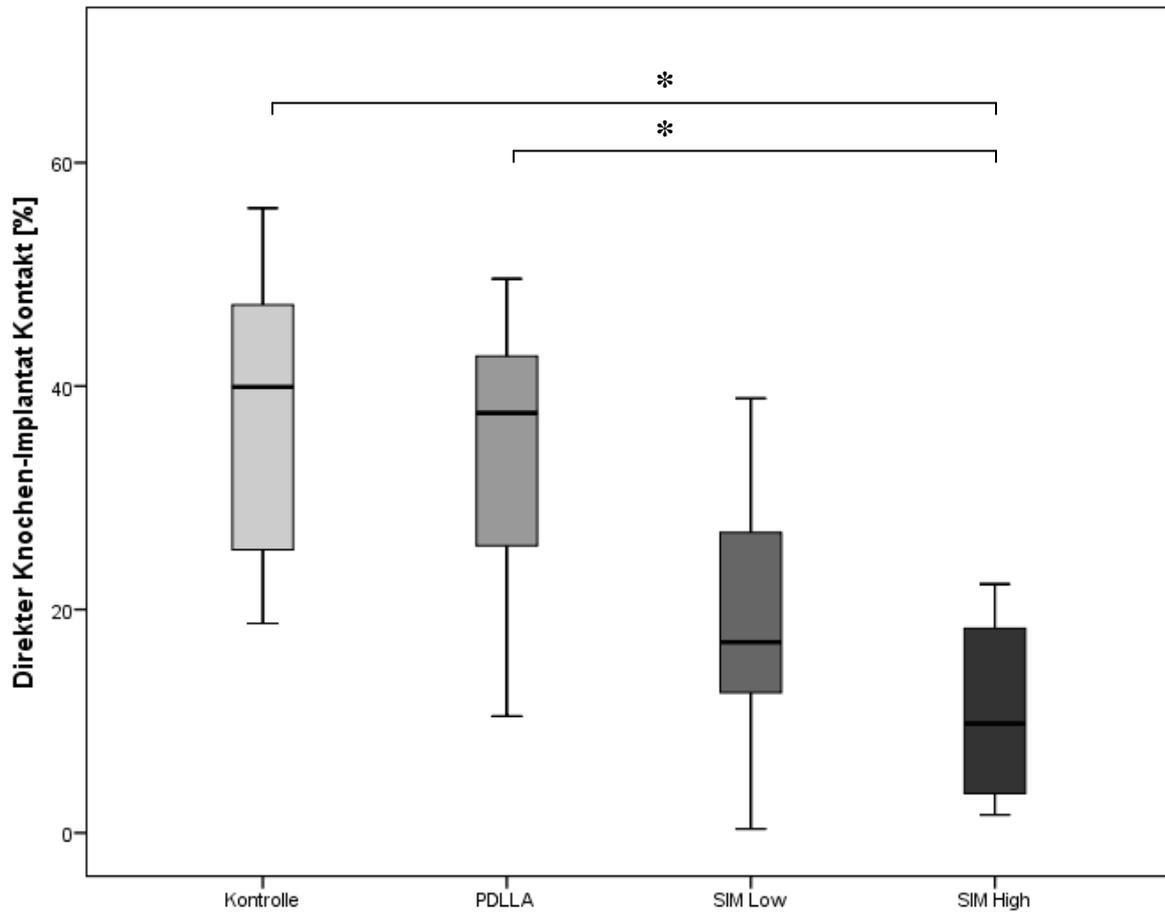


Abb. 17: Histologisches Ergebnis des direkten Knochen-Implantat Kontaktes.

Indirekter Knochen-Implantat Kontakt

In der statistischen Auswertung zeigten sich signifikant geringere indirekte Knochen-Implantat Kontakte der SIM High Gruppe gegenüber der PDLLA-Gruppe (s. Abb. 18).

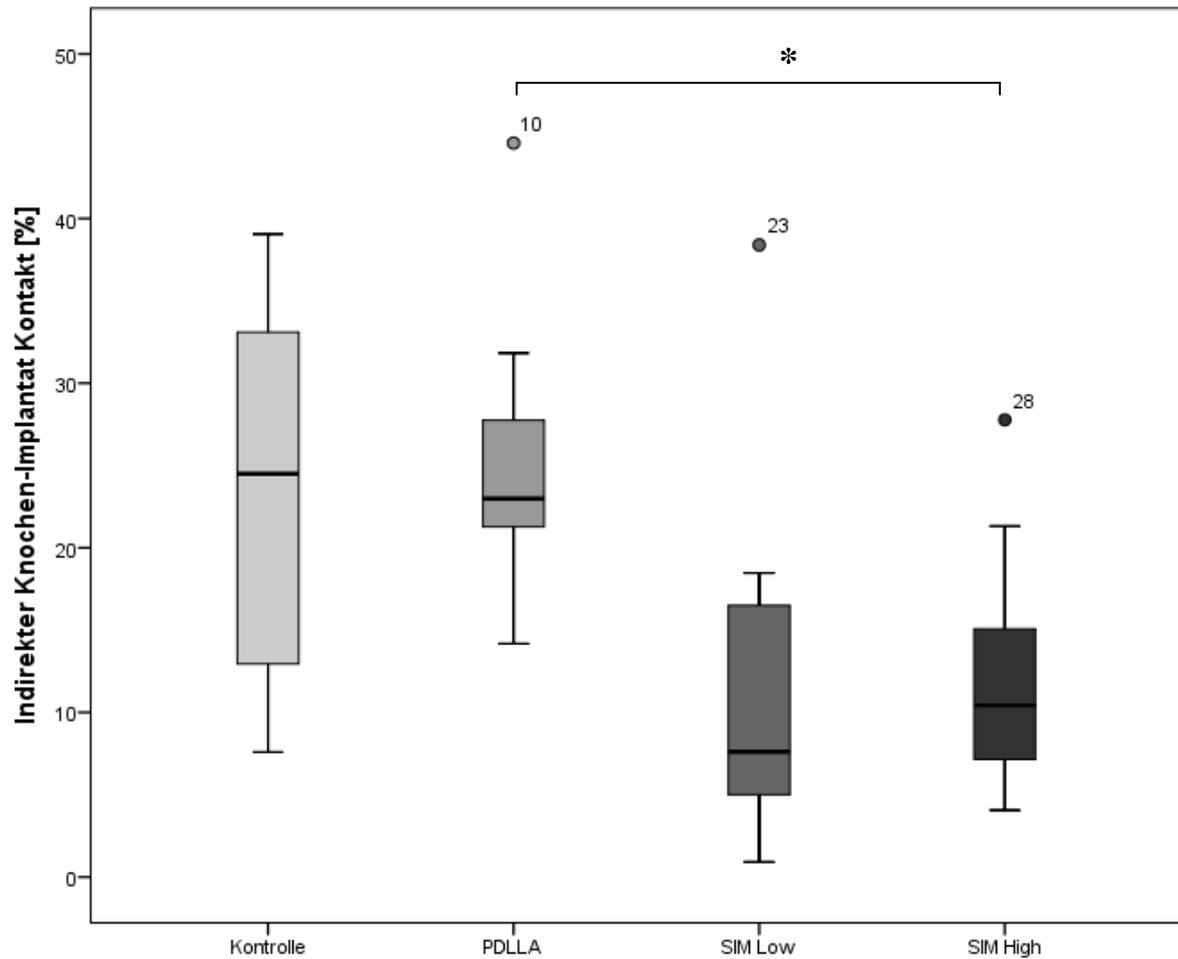


Abb. 18: Histologisches Ergebnis des indirekten Knochen-Implantat Kontaktes.

Bone Area

Die statistische Auswertung der Bone Area zeigte einen signifikant größeren trabekulären Knochenanteil in der Bone Area der Kontrollgruppe gegenüber der Bone-Area in allen anderen Gruppen. Der Knochenanteil der Bone Area in der PDLLA Gruppe war signifikant größer als der Anteil in der SIM High Gruppe (s. Abb. 19).

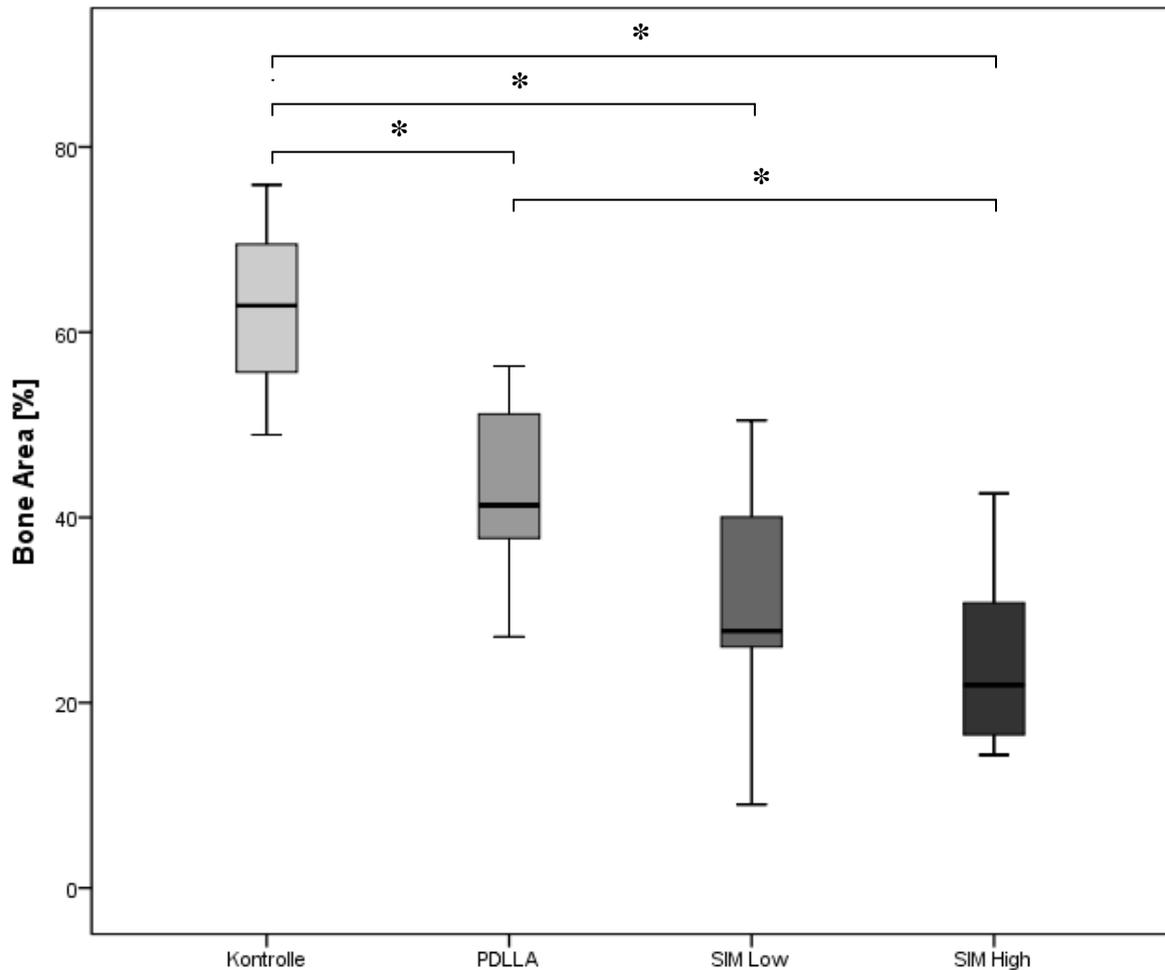


Abb. 19: Histologisches Ergebnis der Bone Area

6 Diskussion

Zusammenfassung Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die radiologische, biomechanische und histomorphometrische Untersuchung der Implantatintegration eines mit Simvastatin und PDLLA beschichteten Implantates am Rattenmodell. Die Hypothese war ein positiver knochenanaboler Effekt der Simvastatinbeschichtung nach 56 Tagen Standzeit in der biomechanischen und histologischen Untersuchung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keine verbesserte Implantatintegration unter lokaler Applikation von 50µg- bzw. 100µg Simvastatin auf dem Trägermaterial PDLLA am Rattenmodell. In der biomechanischen Untersuchung zeigten sich für die Fixierungskraft signifikant niedrigere Stabilität der Knochen aus der SIM High Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der PDLLA-Gruppe. In der histologischen Untersuchung zeigte die Messung des gesamten und des direkten Knochen-Implantatkontaktes signifikant geringere Knochen-Implantatkontakte der SIM High Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der PDLLA-Gruppe.

Die Messung der indirekten Knochen-Implantatkontakte zeigte signifikant geringere Knochen-Implantatkontakte der SIM High Gruppe gegenüber der PDLLA-Gruppe.

Die Auswertung der Bone Area ergab signifikant geringere Knochenneubildung in der ausgemessenen Region of interest in der SIM High Gruppe gegenüber beiden Kontrollgruppen.

Die Ergebnisse der SIM Low Gruppe zeigen im Vergleich zu Kontroll- und PDLLA Gruppe geringere biomechanische und histologische Qualität, jedoch ohne Signifikanz.

Zusammenfassend wurde die Implantatintegration in der vorliegenden Arbeit unter lokaler Statinwirkung verschlechtert. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit, eine verbesserte Implantatintegration unter lokaler Implantatbeschichtung mittels Simvastatin auf dem lokalen, biodegradierbaren Trägermaterial PDLLA zu erreichen, muss verworfen werden.

Im Folgenden stehen mögliche Begründungen für die vorliegenden Ergebnisse zur Diskussion.

Reevaluation Hypothese

Radiologie

Im Rahmen der radiologischen Nachkontrolle wurden in drei Femora Osteolysen festgestellt. Die betroffenen Tiere waren der Gruppe des hoch dosierten Simvastatins (SIM High) zugeordnet. Bei Verdacht auf intramedulläre Infektionen erfolgte die Entnahme und Einsendung von mikrobiologischen Abstrichen aus den osteolytischen Knochen. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung waren negativ, eine Infektion wurde ausgeschlossen. Da die betroffenen Femora der histologischen Untersuchung zugeführt wurden kann kein Zusammenhang zwischen den radiologischen Osteolysen und den Ergebnissen der biomechanisch untersuchten Femora bestehen.

Trägermaterial PDLLA

Bereits 1960 wurde PDLLA als elektrochemisch hergestelltes, biokompatibles, biodegradierbares Drug Delivery System eingeführt. Als Vorteil dieses Trägermaterialies gilt, dass Substanzen ohne Wirkverlust eingearbeitet und kontinuierlich lokal freigesetzt werden können, während das Trägermaterial eine hohe mechanische Stabilität aufweist und somit auch als lokale Beschichtung im Rahmen z.B. der Implantation von Osteosynthesematerialien bestand hat (23, 28, 30). Als zusätzlicher Vorteil von PDLLA gegenüber anderen Trägermaterialien gilt, dass die Substanzen in biologisch aktiver Form eingearbeitet werden können. In mehreren Studien zeigte sich hierbei, vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, eine deutlich höhere biomechanische Stabilität und histologische Qualität der mit PDLLA beschichteten Implantate im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollen (29), (33), (34), (36), (37). Osteolysen zeigten sich in keiner der genannten Studien. In der vorliegenden Arbeit weisen die mit PDLLA beschichteten Implantate deutlich bessere biomechanische und histologische Eigenschaften im Vergleich zu den Simvastatinbeschichteten Gruppen auf. Dies spricht gegen PDLLA als Ursache für die im Vergleich geringere biomechanische und histologische Implantatintegration der mit Simvastatin beschichteten Implantate.

Vergleich Literatur - Statinwirkung auf den Knochen

In der Vergangenheit durchgeführte Studien konnten bei oraler, subkutaner, intraperitonealer, sowie lokaler Applikation von Simvastatin in den Dosierungen von 0,1 bis 120mg/kg KG knochenanabole Effekte am Tiermodell zeigen (57), (105), (60), (63), (37, 71), (68), (69), (64), (61), (84), (72).

Dabei ist die Ursache der durch Simvastatin hervorgerufenen knochenanabolen Effekte bis heute nicht gänzlich geklärt. Angenommen wird eine Stimulierung der Expression und Induktion der Transkription von BMP-2 durch Simvastatin, welche Mundy et al. im Rahmen eines Screenings von 30.000 Substanzen feststellte (106). BMP-2 fördert die Osteoblastenproliferation und –differenzierung und wird im Rahmen der Frakturheilung im Bereich der Frakturzone unter natürlichen Bedingungen hochreguliert. Im Rahmen der Frakturheilung ist daher bei vermehrter Expression von BMP-2 und zusätzlicher Applikation von Simvastatin mit einem knochenaufbauenden Effekt zu rechnen. Diese Hypothese hat sich in vorhergehenden Studien am Frakturmodell bestätigt (37), (30). Viele Studien haben die Wirkung von Statinen und speziell Simvastatin auf die Frakturheilung am Tiermodell im Rahmen unterschiedlicher Applikationsformen, Dosierungen und Standzeiten getestet und knochenanabole Effekte nachgewiesen (66), (65), (37), (67), (64), (60), (63), (61), (62).

Zusammenfassend zeigte sich unter oraler, lokaler, sowie subkutaner Applikation von Statinen auf unterschiedlichen Trägermaterialien und teilweise unter direkter Applikation ohne Trägermaterial im Frakturmodell in vitro sowie in vivo ein knochenanaboler Effekt. Die genannten Studien haben die Untersuchung der Wirkung von Statinen auf die Frakturheilung gemeinsam. Im Gegensatz dazu erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Wirkung von Statinen auf die Implantatintegration. Letztere wurde ebenfalls im Rahmen einer Vielzahl von Studien unterschiedlichen Designs untersucht, zu beachten auch hier Unterschiede in der Applikationsform, Dosierung und Standzeit.

Frakturmodell versus Implantatmodell

Aufgrund der nachgewiesenen knochenanabolen Effekte unter lokaler Simvastatin Applikation im Frakturmodell der Arbeitsgruppe (37) ist bei identischer Applikation, lokal, und Dosierung, 50µg, neben unterschiedlicher Standzeit von 28 bzw. 42 Tagen bei Pauly et al. versus 56 Tagen in der vorliegenden Arbeit, das Tiermodell zu diskutieren. Es stellt sich die Frage inwiefern Unterschiede im physiologischen Ablauf von

Frakturheilung versus Implantatintegration bezogen auf die Statinwirkung als Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Studie dienen können.

Wie bereits einleitend aufgeführt verläuft die primäre und sekundäre Knochenheilung in unterschiedlichen Phasen. Durch das Trauma im Rahmen einer Fraktur bzw. durch den Mechanismus des Einbringens von Implantaten kommt es lokal zur Entstehung eines Defektes mit Ausbildung eines Hämatoms, Einwanderung und Proliferation unterschiedlicher Zellen, welche eine Inflammation hervorrufen. Aus dem Hämatom bildet sich über das sogenannte Granulationsgewebe im Rahmen des Remodelling das neue Knochenmaterial (38). In diesem Zusammenhang gilt es erneut, die pleiotropen Effekte der Statine zu betrachten, die Förderung der Angiogenese, Senkung der Thrombozytenaggregation, die vasodilatative, antiproliferative, immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung (90), (93, 107, 108). (56), (57), (58).

Die Angiogenese ist essentiell für beide Formen der Frakturheilung, die primäre und sekundäre Frakturheilung. Sie beginnt um den 3. Tag posttraumatisch. Von Weis et al. wurde ein biphasischer, dosisabhängiger Effekt der Statine auf die Angiogenese beschrieben (92). Niedrige Statindosierungen (0.005 - 0.01 mol/L) förderten die Angiogenese, während hohe Statindosierungen (0.05 - 1 mol/L) zu einer Abnahme der Angiogenese führten. Im Rahmen der Frakturheilung kommt es lokal zu einem Gewebetrauma, in der Folge zur Entstehung eines Hämatoms mit Inflammation. Je größer das lokale Hämatom und die anschließende Inflammation, desto größer eine potentiell angiogenetische und antiinflammatorische Wirkung der Statine. Die Revaskularisierung des traumatisierten Gewebes und somit Unterstützung der Defektheilung durch Förderung der Angiogenese durch Statineinfluss könnte im Rahmen der Frakturmodelle eine größere Rolle spielen als in den Implantatmodellen, da bei ersterem ein größerer lokaler Defekt vorliegt und im Rahmen der Implantatintegration wie im vorliegenden Modell kein ossärer Defekt vorbestand. Die intramedulläre Implantation eines Kirschnerdrahtes verursacht lediglich ein geringes lokales Hämatom insbesondere diaphysär und damit in der untersuchten Region of Interest, der Bone Area der vorliegenden Arbeit.

Die ebenfalls den Statinen zugeschriebene antiinflammatorische Wirkung (90), (109) zeigte sich laut Sparrow et al. in vivo nach Applikation von 3mg/kg Simvastatin per oral unabhängig von der cholesterinsenkenenden Wirkung dieser Stoffgruppe. Vermutet wird der Ursprung dieser Wirkung in einer Hemmung der Aktivität der Proteine aus der Rho-

Familie. Diese GTPasen sind verantwortlich für unterschiedliche Signalwege im Rahmen von Entzündungsreaktionen. GTPasen unterlaufen den Prozess der Protein Geranylierung, ein Schritt des Cholesterinstoffwechsels, welcher durch Statine gehemmt wird (110), (111). Es ist davon auszugehen, dass analog der proangiogenetischen Statinwirkung die antiinflammatorische Wirkung der Statine von Dauer und Ausmaß der vorliegenden Inflammation abhängig ist. Es ist anzunehmen, dass die im Rahmen einer Fraktur auftretende lokale Entzündungsreaktion sich hierbei von der lokalen Entzündungsreaktion im Rahmen einer retrograden Implantation eines K-Drahtes in intaktes Knochengewebe, wie in vorliegender Arbeit durchgeführt, in Ausmaß und Dauer unterscheidet, im Rahmen der Frakturheilung ausgeprägter stattfindet als im Rahmen der Implantatintegration. Die Implantatintegration würde somit in geringerem Ausmaß durch Statinapplikation unterstützt, als die Frakturheilung. Dies könnte die knochenanabole Wirkung von Statinen im Frakturmodell beispielsweise von Pauly et al. erklären. Widersprüchlich ist hierbei, dass die unterschiedlichen Phasen der Frakturheilung in unterschiedlichem Ausmaß auch auf die Implantatintegration übertragbar sind (112) und oben genannte Studien analog dazu einen knochenanabolen Effekt von Statinen auch im Rahmen der Implantatintegration gezeigt haben. Darüber hinaus implizieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine signifikant schlechtere Knochenheilung unter Statinapplikation im Sinne einer Hemmung der Ausbildung von Knochen-Implantatkontakten. Die Ergebnisse von Weis et al. aufgreifend könnte eine hohe Statindosierung wie in vorliegender Arbeit in der SIM High Gruppe eine Abnahme der proangiogenetischen und antiinflammatorischen Statinwirkung zur Folge haben, einen dosisabhängigen Effekt der Statine implizieren.

Applikationsform, Dosierung und Standzeit

In der Vergangenheit durchgeführte Studien, welche einen dosis-abhängigen knochenanabolen Effekt unter oraler, subkutaner, intraperitonealer und lokaler Applikation von Simvastatin zeigen konnten, fanden in vitro sowie in vivo mit und ohne vorherige Fraktur- bzw. Implantathistorie statt. Somit liefern Unterschiede im Mechanismus von Frakturheilung versus Implantatintegration keine ausreichende Begründung für oder gegen eine knochenanabole Wirkung von Statinen und erklären die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend. Da sich genannte Studien auch hinsichtlich der Applikationsform, der Dosierung der angewendeten Statine und

der Standzeiten unterscheiden, gilt es, diese Parameter zu vergleichen, hier nun ungeachtet des Tiermodells.

Orale Applikation

Es haben sich signifikante knochenanabole Effekte unter Statindosierungen (Fluvastatin und Lovastatin sowie Simvastatin) per oral von 5mg/kg KG (71), 10-25mg/KG (65, 76), sowie 120mg/kg KG (60) gezeigt. Bei Du et al. erfolgte die orale Applikation von 5mg/kg täglich über den gesamten Untersuchungszeitpunkt, nicht einmalig. Hierbei handelte es sich darüber hinaus um ein Osteoporosemodell der Ratte. Zudem war die Standzeit mit 28 bzw. 84 Tagen, wesentlich früher und später als in vorliegender Arbeit. Die Dosierungen von 120mg/kg KG per oral wurden mit 8, 14 und 21 Tagen Standzeit nach wesentlich kürzeren Zeitpunkten getestet als in vorliegender Studie, zudem erfolgte die Applikation bei Skoglund et al. nicht einmalig sondern täglich über die gesamte Standzeit analog zu Du et al. Die von Gutierrez et al. verwendete orale Dosierung von Lovastatin 10-25mg/kg KG zeigte nach 2 bzw. 6 Wochen signifikante knochenanabole Ergebnisse. Eine Untersuchung nach 8 Wochen fand nicht statt.

Transdermale Applikation

Gutierrez et al. (65) untersuchten neben der oralen Applikation die transdermale Applikation von Lovastatin auf die Frakturheilung am Rattenmodell. Hier zeigte die transdermale Applikation von 0,1-5mg/kg KG Lovastatin über 5 Tage postoperativ signifikante knochenanabole Effekte nach 4 Wochen Standzeit, einer wesentlich kürzeren Standzeit als in der vorliegenden Arbeit.

Masuzaki et al. (70) wendeten eine Kombination aus einem injizierbaren Poly-laktid (-co-glycolic Säure) als Trägermaterial für Fluvastatin als einmalige transdermale Applikation von 0,5mg/kg bzw. 1,0mg/kg Fluvastatin an. Hier im Gegensatz zu vorliegender Studie Anwendung von Fluvastatin und Standzeit von 2 und 4 Wochen.

Subkutane Applikation

Die Arbeitsgruppe um Skoglund et al. führte gleichzeitig zu der lokalen Applikation von 0,1mg/kg KG lokal via osmotischer Minipumpe eine *subkutane* Applikation von 5mg/kg, 10mg/kg ebenfalls via osmotischer Minipumpe, sowie 20mg/kg als subkutane Injektion durch. Für die subkutane Injektion zeigten sich keine signifikant knochenanabolen Effekte. Die kontinuierliche Statinfreisetzung via osmotische Minipumpe subkutan sowie

lokal zeigte jedoch signifikant bessere biomechanische Eigenschaften. Auch hier erfolgte die Applikation jedoch täglich bei einer Standzeit von nur 14 Tagen.

Wang et al. applizierten 10mg/kgKG *subkutan* für 5 Tage am Frakturmodell der Ratte mit hierunter signifikant besserer Frakturheilung, jedoch am osteoporotischen Tiermodell. Die Standzeit betrug 1, 2 und 4 Wochen.

Basarir et al. applizierten 50mg/kg KG *subkutan* nach bilateraler Implantation eines Titanzylinders in Kaninchenfemora. Zu Erwähnen hierbei ist neben der vergleichsweise hohen Konzentration, dass es sich um einen Versuch am Kaninchen handelte. Zusätzlich ist die Versuchstierzahl mit 20 Tieren gering. Die Standzeit der Studie betrug 6 Wochen.

Intraperitoneale Applikation

Die intraperitoneale Simvastatinapplikation wurde mit 10mg/kg/Kg (68) als signifikant knochenanabol erarbeitet. Später folgende Dosierungen der gleichen Arbeitsgruppe mit gleichem Studiendesign von 0.125, 1,5 bis 10mg/kg Simvastatin zeigten ebenfalls signifikante knochenanabole Ergebnisse für die Dosierung von 10mg/kg/KG intraperitoneal (69). In beiden Studien war die Standzeit mit 30 Tagen wesentlich geringer als in vorliegender Arbeit.

Serin-Kilicoglu et al. (64) applizierten 1 bzw. 2mg Simvastatin lokal subkutan im Bereich der Frakturzone nach geschlossener Tibiafraktur und konnten signifikant schnellere Frakturheilung darstellen, jedoch ohne Ausarbeitung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den unterschiedlichen Dosierungen. Die Applikation erfolgte am Trauma-Tag sowie an Tag 1 bis 4 posttraumatisch, auch hier eine wesentlich kürzere Standzeit mit 7, 14 und 21 Tagen.

Lokale Applikation

Pauly et al. (37) wendeten Simvastatin lokal als Implantatbeschichtung am Rattenmodell in den Dosierungen 3µg versus 50µg an. Es zeigte sich signifikant stabilerer Knochen in der biomechanischen Untersuchung der Gruppe mit 50µg Simvastatin. In vorliegender Arbeit erfolgte die Anwendung der gleichen Dosierung (SIM Low), hier jedoch ohne Nachweis eines knochenanabolen Effektes. Die Standzeit war mit 28 bzw. 42 Tagen gegenüber 56 Tagen geringer.

Lee et al. (84) untersuchten die *lokale suprapariostale* Applikation von Simvastatin in den Dosierungen 0,1mg, 0,5mg, sowie 1mg im Bereich der Mandibula am

Rattenmodell. Es erfolgte kontralateral die supraperiostale Injektion von einmalig 0,5mg, sowie 0,1mg versus 0,5mg dreimal wöchentlich. Es zeigte sich ein signifikant größeres Areal neu gebildeten Knochens in der Gruppe mit multiplen Simvastatin Injektionen à 0,5mg nach 24 Tagen gegenüber einmaliger Injektion von 0,5mg, sowie gegenüber multiplen Injektionen à 0,1mg Simvastatin. 90 Tage post injectionem zeigte sich signifikant weniger Knochenneubildung nach multiplen Simvastatin Injektionen im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt nach 24 Tagen. Nach wie vor zeigte sich eine deutlichere Knochenneubildung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Die biomechanische Testung zeigte analog nach 24 Tagen signifikant größere „force to fracture“ in der Gruppe mit multiplen Simvastatin Injektionen gegenüber der Kontrollgruppe.

Garret et al. (66) applizierten mit 5ng/ml Lovastatin beschichtete Nanopartikel lokal in Femurfrakturen am Rattenmodell in vitro. Neben der Anwendung von Lovastatin unterscheidet sich diese Studie von vorliegender Arbeit in einer nur halb so langen Standzeit von 4 Wochen und der täglichen Applikation.

Piskin et al. (67) untersuchten den Einfluss von 20µg Simvastatin lokal auf dem Trägermaterial Polycaprolakton als Scaffoldbeschichtung im Rahmen der kranialen Defektheilung am Rattenmodell. Die Untersuchung nach 1, 3 und 6 Monaten zeigte histologisch vermehrte Osseointegration der Simvastatinbeschichteten Implantate im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle. Die verwendete Dosierung von 20µg liegt deutlich unter der niedrigen Simvastatindosis von 50µg der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse lassen sich mit denen von Moriyama et al. vergleichen. Die Untersuchungszeitpunkte liegen vor und nach der Standzeit von 56 Tagen.

Wong et al. (62) applizierten gelöstes Simvastatin in einer Dosis von 2,5mg/ml im Bereich eines kranialen Knochendefektes am Kaninchen und untersuchten histologisch nach 2 Wochen Standzeit. Es zeigte sich signifikant vermehrte Knochenbildung in der mit Simvastatin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit Defektdeckung durch Kollagen. Auch hier finden sich eine wesentlich kürzere Standzeit sowie eine geringere Versuchstierzahl als in vorliegender Arbeit.

Moriyama et al. (73) applizierten lokal Fluvastatin in den Dosierungen 3µg, 15µg und 75µg zeigten signifikant erhöhte Push-Out Kraft in der Gruppe mit der höheren Fluvastatin Konzentration, 15µg. Nach einer Standzeit von zwei Wochen zeigte sich signifikant erhöhter Knochen-Implantat Kontakt, Knochenvolumen und Push-Out Kraft

der Gruppe mit der höchsten Fluvastatin Konzentration, 75µg. Hier erfolgte im Unterschied zur vorliegenden Studie erneut die Anwendung von Fluvastatin, sowie die Wahl einer geringeren Standzeit mit 1 bzw. 2 Wochen.

Andere, den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entsprechende Ergebnisse fanden Cottrell et al. Cotrell et al. (83) führten die Implantatbeschichtung mit Lovastatin (11,56mg versus 1,3mg), Alendronat und Omeprazol nach lokalem kortikalem Defekt im Bereich des distalen Femurs am Rattenmodell durch. Es erfolgte die bilaterale Implantation eines K-Drahtes jeweils mit einer der o.g. Beschichtung vs. ohne Beschichtung. Es erfolgte die radiologische Auswertung des Femurs bei einliegendem beschichtetem Implantat mittels mikro-CT unter Bestimmung von Knochendichte und Knochenmineralisation. Zusätzlich erfolgte die histologische Ausmessung der Knochenneubildung nach Anfärbung der erstellten Präparate mit Färbung nach van Gieson. Bezüglich der mit Lovastatin beschichteten Implantate wurde kein positiver Einfluss auf die Knochenheilung unter Applikation von 0,001mg/kg erzielt.

Wie beschrieben finden sich in der Literatur bei oraler, intraperitonealer, sowie lokaler Beschichtung von Implantaten mit Simvastatin an unterschiedlichen Tiermodellen, sowie mit unterschiedlichen Dosierungen und zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten signifikante knochenanabole Effekte. In oben genannten Studien mit oraler Statinapplikation erfolgte ungeachtet des Tiermodells die orale Applikation in Dosierungen von 1mg/kg KG bis 120mg/kg KG. Dies entspricht einem Vielfachen der Dosierung, welche in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand, 50µg und 100µg, hier in lokaler Form. Bei oraler Applikation von Statinen erreichen aufgrund des hohen First-Pass Effektes in der Leber nur ca. 5% der verabreichten Dosis den systemischen Kreislauf und damit den gewünschten Wirkort Knochen. Dies hat zur Folge, dass ein Vielfaches der gewünschten Dosis per oral verabreicht werden muss, um den gewünschten knochenanabolen Effekt am Knochen aufzuweisen.

Die orale Dosierung der Statine im klinischen Alltag rangiert zwischen 20 bis 40mg pro Tag bei einem geschätzten durchschnittlichen Körpergewicht der Betroffenen von 80kg. Bei einer Steigerung der Tagesdosis auf das 3-fache oder mehr steigt das Risiko für das Auftreten der Nebenwirkungen wie Leberversagen, Rhabdomyolyse u.a. erheblich an. Eine klinische Anwendung dieser Dosierung wäre nicht durchführbar. Dennoch haben oben genannte Studien deutlich gemacht, dass bei hohen systemischen Dosierungen der Statine knochenanabole Effekte am Tiermodell vorzuweisen sind.

Aufgrund dieser Tatsache stellt die lokale Darreichungsform, unter Umgehung des systemischen Kreislaufes und damit der Statin induzierten Nebenwirkungen ein vielversprechendes Vorhaben dar.

Die ebenfalls in oben genannten Studien vielversprechende intraperitoneale Applikation stellt keine umsetzbare Alternative für die klinische Anwendung aufgrund der aufwendigen Verabreichung in Verbindung mit hohem Risiko für Nebenwirkungen und Komplikationen durch die Darreichungsform dar.

Im Unterschied zu den beiden genannten Applikationsformen fand in der vorliegenden Arbeit die lokale Applikation von Simvastatin in den Dosierungen 50µg und 100µg statt, hier als Implantatbeschichtung. Die niedrigere Dosierung mit 50µg hatte bereits in der Studie der Arbeitsgruppe (37) am Frakturmodell der Ratte knochenanabole Effekte gezeigt. Da hier die vergleichbare Anwendung unter Verwendung des Trägermaterials PDLLA stattfand, stellt sich die Frage, wie die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu erklären sind. Bei gleicher Dosierung und identischem Trägermaterial unterscheiden sich beide Studien durch unterschiedliche Standzeit, 56 Tage in der vorliegenden Arbeit versus 28 und 42 Tage bei Pauly et al. Zudem untersuchten Pauly et al. am Frakturmodell der Ratte, während vorliegende Arbeit die Implantatintegration untersuchte. Es ist daher anzunehmen, dass neben dem unterschiedlichen Pathomechanismus, Implantatintegration versus Frakturheilung auch die Standzeit möglicherweise ursächlich für die divergenten Ergebnisse beider Studien ist.

Klinische Anwendbarkeit Studienergebnisse

Neben bereits erwähnter Studie von Pauly et al. wiesen Wong et al. (62) nach einer Standzeit von 14 Tagen knochenanabole Effekte nach lokaler Behandlung parietaler Defekte mit Simvastatin nach. Schmidmaier et al. (30) wählten die Untersuchungszeitpunkte nach 28 und 42 Tagen und konnten biomechanisch und histologisch knochenanabole Effekte von Simvastatin bzw. BMP-2 nachweisen. Thorey et al. (52) untersuchten die Implantatintegration am Kaninchen nach einer Standzeit von 28 Tagen und zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Implantatintegration. Serin-Kilicoglu zeigte nach einer Standzeit von 7, 14 und 21 Tagen (64) verbesserte Frakturheilung unter Simvastatineinfluss. Du et al. (71), fanden 56 Tage nach Ovariectomie der Versuchstiere und oraler Applikation von Simvastatin nach 28 bzw. 84 Tagen Standzeit signifikante knochenanabole Effekte unter

Simvastatineinfluss. Ayukawa et al. konnten nach intraperitonealer Applikation von Simvastatin nach 30 Tagen Standzeit die Implantatintegration als verbessert darstellen (69). Mehrere vorhergehende Studien wiesen unabhängig von der gewählten Standzeit einen phasenabhängigen, mit der Zeit unterschiedlichen Wirkungsverlauf von Simvastatin (84, 63) nach.

Lee et al. (84) untersuchten unterschiedliche lokale Applikationsformen mit 0,1mg, 0,5mg und 1mg Simvastatin supraperiostal im Bereich der Mandibula bilateral am Rattenmodell auf einem Träger aus Zellulose und Polylaktid, bzw. ohne Träger ohne das Setzen eines chirurgischen Defektes. Die histologische und biomechanische Analyse nach 3, 7, 24 Tagen zeigte ein signifikant größeres Areal neu gebildeten Knochens in der Gruppe mit multiplen Simvastatin Injektionen á 0,5mg gegenüber einmaliger Injektion von 0,5mg, sowie gegenüber multiplen Injektionen á 0,1mg Simvastatin. Hier zeigte sich neben dem ausgemessenen neugebildetem Knochen eine erhöhte biomechanische Stabilität. 90 Tage post injectionem erfolgte bereits das Remodeling des Knochens mit Einbuße der mechanischen Eigenschaften, wobei nach wie vor 55% der simvastatininduzierten Knochenneubildung erhalten blieben, jedoch ohne Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In Anlehnung an die Modelle der Frakturheilung bzw. Implantatintegration erfolgte die Wahl des Untersuchungszeitpunktes in der Mehrheit oben genannter Studien an Tag 7, 14, 21, 28 und 42, also wesentlich früher als in der vorliegenden Arbeit.

Weitere Studien zeigten nach wesentlich längeren Standzeiten von 85 Tagen, 90 Tagen und 6 Monaten knochenanabole Effekte unter Statinwirkung. So zeigten Piskin et al. positive Effekte von Simvastatin auf die Knochenheilung nach knöchernem Defekt im Rattenmodell nach Standzeiten von 3 und ausgeprägter 6 Monaten (67). Nach 12 Wochen Standzeit und oraler Statinapplikation von 1mg, 2mg, 5mg und 20mg fanden Maritz et al. (105) knochenanabole Effekte mit Darstellung signifikant erhöhter Knochenbildung und –resorption unter 20mg Dosierung bei signifikant erniedrigter Knochenneubildung und erhöhter Knochenresorption unter Dosierung von 1mg Simvastatin. Hier erneut Hinweis auf eine dosisabhängige Simvastatinwirkung.

Andere Ergebnisse fanden Patil et al. nach 12 Wochen Standzeit nach distaler Radiusfraktur und oraler Statineinnahme mit fehlender Signifikanz bezüglich untersuchter Zeit bis zur klinisch und radiologisch darstellbaren Frakturheilung.

Zusammenfassend deuten oben genannte Studien trotz erschwelter Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichem Studiendesign darauf hin, dass die Statinwirkung nicht nur dosisabhängig verläuft sondern im Sinne eines Wirkprofils in Abhängigkeit von der Zeit erfolgt.

Die Wirkung durch Simvastatin wurde von Mundy et al. ca. 3-5 Tage nach Applikation, von weiteren Autoren nach 7-14 Tagen (64) (63), bzw. 10 und 14 Tagen (57) beschrieben, letztere in vitro. Konkretere Aussagen über Dauer und Phasenverlauf der Wirkung Simvastatins auf den Knochen liegen bislang nicht vor. Aufgrund der knochenanabolen Ergebnisse in Studien nach 28 und 42 Tagen Standzeit muss daher diskutiert werden, ob die Standzeit von 56 Tagen zu lang gewählt wurde und pleiotropen Effekte der Statine, hierunter die knochenanabolen Effekte zu diesem Zeitpunkt bereits nicht mehr abrufbar sind. Für die in dieser Arbeit gewählte Standzeit nach 56 Tagen und gegen eine Untersuchung nach 28 bzw. 42 Tagen spricht jedoch die klinische Anwendbarkeit der Ergebnisse. Sechs bis acht Wochen, also 56 Tage postoperativ erfolgen in Anlehnung an Modelle der Knochenheilung reguläre Nachkontrollen nach Implantatimplantation bzw. Frakturversorgung. In Rahmen der entsprechenden Nachuntersuchungszeitpunkte werden Prognosen über Therapieergebnisse aufgestellt und Weiterbehandlungskonzepte festgelegt. Der Status der Implantatintegration bzw. knöchernen Konsolidierung zu diesem Zeitpunkt ist somit maßgeblich. Studien mit dem Ziel der Übertragbarkeit ihrer Ergebnisse auf den klinischen Alltag sollten darauf abzielen, die Effekte der untersuchten Substanzen zu diesen Zeitpunkten darzustellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Bulletin of The World Health Organisation www.who.int/bulletin/volumes/81/9/en Growing Burden of musculoskeletal disorders; 2003:646-656.
2. Koch HE, Schofer MD, Fuchs-Winkelmann S, et al. [From natural growth to artificial composition: the use of artificial materials in endoprosthetics from a cultural-historical perspective]. *Orthopade*;39:75-79.
3. Wessinghage D. [Historical aspects of joint prosthesis implantation. A bibliographic study]. *Orthopade* 2000;29:1067-1071.
4. Kienapfel H, Griss P, Hinrichs F. [DRG based development of revenues in orthopaedic surgery. A comparison on the development of cost weights and average lengths of hospital stay in Germany (G -DRG V1.0) and in Australian teaching hospitals (AR -DRG 4.1)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003;141:261-271.
5. Schnabel PB, S. Endoprothesenregister: Höchsten Anforderungen genügen. *Deutsches Ärzteblatt* 2011;108 (48):2598 -2602.
6. Wirtz DC. [Hip revision endoprosthesis. More often--more important]. *Orthopade* 2009;38:665-666.
7. Merx H, Dreinhofer KE, Gunther KP. [Socioeconomic relevance of osteoarthritis in Germany]. *Z Orthop Unfall* 2007;145:421-429.
8. Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, et al. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89 Suppl 3:144-151.
9. Sun Y, Sturmer T, Gunther KP, et al. [Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1997;135:184-192.
10. König A, Kirschner S. [Long-term results in total knee arthroplasty]. *Orthopade* 2003;32:516-526.
11. Hardoon SL, Lewsey JD, Gregg PJ, et al. Continuous monitoring of the performance of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88:716-720.
12. Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol* 1999;28:483-497.

13. Mumme T, Marx R, Qunaibi M, et al. [Surface pretreatment for prolonged survival of cemented tibial prosthesis components: full- vs. surface-cementation technique]. *Biomed Tech (Berl)* 2006;51:95-102.
14. Marx R, Qunaibi M, Wirtz DC, et al. Surface pretreatment for prolonged survival of cemented tibial prosthesis components: full- vs. surface-cementation technique. *Biomed Eng Online* 2005;4:61.
15. Soderman P, Malchau H, Herberts P, et al. Are the findings in the Swedish National Total Hip Arthroplasty Register valid? A comparison between the Swedish National Total Hip Arthroplasty Register, the National Discharge Register, and the National Death Register. *J Arthroplasty* 2000;15:884-889.
16. Herberts P, Malchau H. How outcome studies have changed total hip arthroplasty practices in Sweden. *Clin Orthop Relat Res* 1997;44-60.
17. Skripitz R, Aspenberg P. Tensile bond between bone and titanium: a reappraisal of osseointegration. *Acta Orthop Scand* 1998;69:315-319.
18. Santavirta S, Takagi M, Konttinen YT, et al. Inhibitory effect of cephalothin on matrix metalloproteinase activity around loose hip prostheses. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:244-246.
19. Santavirta S, Xu JW, Hietanen J, et al. Activation of periprosthetic connective tissue in aseptic loosening of total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res* 1998:16-24.
20. Drees P, Eckardt A, Gay RE, et al. Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:165-171.
21. Drees P, Eckardt A, Gay RE, et al. [Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis]. *Biomed Tech (Berl)* 2008;53:93-103.
22. Gradinger RG, H; Schmidmaier, G; Wildemann, B. Experimentelle Grundlagen: Biologische und physiologische Grundlagen. In: Gradinger G, ed. *Ossäre Integration*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006:24-30.
23. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001;28:341-350.

24. Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, et al. Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1987;295:304.
25. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:940-956.
26. Gollwitzer H, Thomas P, Diehl P, et al. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D, L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. *J Orthop Res* 2005;23:802-809.
27. Wildemann B, Bamdad P, Holmer C, et al. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 2004;34:862-868.
28. Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, et al. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L -lactide) implant coating maintain their activity over long -term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2004;25:3639-3644.
29. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, et al. Biodegradable poly(D,L -lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 2001;58:449-455.
30. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, et al. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002;30:816-822.
31. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M, et al. 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 B Appl Biomater* 2003;65:157-162.
32. Schmidmaier G, Wildemann B, Gabelein T, et al. Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. *Acta Orthop Scand* 2003;74:604-610.
33. Wildemann B, Sander A, Schwabe P, et al. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L -lactide) --growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials* 2005;26:4035-4040.
34. Raschke M, Wildemann B, Inden P, et al. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using

- poly lactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone* 2002;30:144-151.
35. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. Osteoinductive implants: the mise-en-scene for drug-bearing biomimetic coatings. *Ann Biomed Eng* 2004;32:398-406.
36. Greiner SH, Wildemann B, Back DA, et al. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L -lactide) -coated implant accelerates fracture healing in rats. *Acta Orthop* 2008;79:717-725.
37. Pauly S, Luttosch F, Morawski M, et al. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone* 2009;45:505-511.
38. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392-1404.
39. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998;22:410-416.
40. Solheim E. Osteoinduction by demineralised bone. *Int Orthop* 1998;22:335-342.
41. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res* 2002;4-10.
42. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1828-1832.
43. 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:1425-1435.
44. Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R, et al. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 1998;60:451-458.
45. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2220-2224.
46. 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:2123-2134.
47. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.

48. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-241.
49. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22:591-603.
50. Schwabe UP, D. *Arzneiverordnungsreport 2004*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2004.
51. Schwabe UP, D. *Arzneiverordnungsreport 2008*. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2008.
52. Thorey F, Menzel H, Lorenz C, et al. Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian J Orthop*;45:57-62.
53. Thorey F, Menzel H, Lorenz C, et al. Enhancement of endoprosthesis anchoring using BMP-2. *Technol Health Care*;18:217-229.
54. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo)* 1976;29:1346-1348.
55. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 2003;144:681-692.
56. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9:2643-2658.
57. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:874-877.
58. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 2004;92:458-471.
59. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:337-342.
60. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:2004-2008.
61. Wang JW, Xu SW, Yang DS, et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 2007;18:1641-1650.

-
62. Wong RW, Rabie AB. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41:244-248.
 63. Skoglund B, Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2007;8:98.
 64. Serin-Kilicoglu S, Erdemli E. New addition to the statin's effect. *J Trauma* 2007;63:187-191.
 65. Gutierrez GE, Edwards JR, Garrett IR, et al. Transdermal lovastatin enhances fracture repair in rats. *J Bone Miner Res* 2008;23:1722-1730.
 66. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, et al. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *J Orthop Res* 2007;25:1351-1357.
 67. Piskin E, Isoglu IA, Bolgen N, et al. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J Biomed Mater Res A* 2009;90:1137-1151.
 68. Ayukawa Y OA, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:346-350.
 69. Ayukawa Y OY, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibia. *J Oral Rehabil* 2010;37
 70. Masuzaki T, Ayukawa Y, Moriyama Y, et al. The effect of a single remote injection of statin-impregnated poly (lactic -co-glycolic acid) microspheres on osteogenesis around titanium implants in rat tibia. *Biomaterials*;31:3327-3334.
 71. Du Z, Chen J, Yan F, et al. Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:145-150.
 72. Basarir K, Erdemli B, Can A, et al. Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants? *Int Orthop* 2009;33:855-859.
 73. Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, et al. Topical application of statin affects bone healing around implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:600-605.
 74. Moriyama Y, Ayukawa Y, Ogino Y, et al. Local application of fluvastatin improves peri-implant bone quantity and mechanical properties: a rodent study. *Acta Biomater* 2010;6:1610-1618.
 75. Ozec I, Kilic E, Gumus C, et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg* 2007;18:546-550.

-
76. Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR, et al. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporos Int* 2006;17:1033-1042.
 77. Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, et al. Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies. *Bone* 2007;40:1581-1587.
 78. Wang PS, Solomon DH, Mogun H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. *JAMA* 2000;283:3211-3216.
 79. Patil S, Holt G, Raby N, et al. Prospective, double blind, randomized, controlled trial of simvastatin in human fracture healing. *J Orthop Res* 2009;27:281-285.
 80. Reid IR, Tonkin A, Cannon CP. Comparison of the effects of pravastatin and atorvastatin on fracture incidence in the PROVE IT-TIMI 22 trial--secondary analysis of a randomized controlled trial. *Bone* 2005;37:190-191.
 81. 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.
 82. Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Arch Intern Med* 2000;160:2865.
 83. Cottrell JA, Vales FM, Schachter D, et al. Osteogenic activity of locally applied small molecule drugs in a rat femur defect model. *J Biomed Biotechnol*;2010:597641.
 84. Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, et al. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials* 2008;29:1940-1949.
 85. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430.
 86. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999;282:2340-2346.
 87. Pedersen TR, Tobert JA. Simvastatin: a review. *Expert Opin Pharmacother* 2004;5:2583-2596.
 88. Armitage. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007;370.
 89. Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Dis* 2006;12:85-101.

-
90. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999;100:230-235.
 91. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, et al. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000;32:164-176.
 92. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739-745.
 93. Walter DH, Fichtlscherer S, Britten MB, et al. Statin therapy, inflammation and recurrent coronary events in patients following coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:2006-2012.
 94. Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, et al. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 2007;282:26832-26844.
 95. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, et al. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 2004;5:81-87.
 96. 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.
 97. 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;335:1001-1009.
 98. Tonkin AM, Colquhoun D, Emberson J, et al. Effects of pravastatin in 3260 patients with unstable angina: results from the LIPID study. *Lancet* 2000;356:1871-1875.
 99. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*;376:1670-1681.
 100. Annual Report For The Fiscal Year 2010. New Jersey: Merck & Co., Inc.; 2010.
 101. Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungsreport 2010. Heidelberg: Springer Verlag; 2010.
 102. Zylka-Menhorn V. Bayer/Lipobay: Ringen um die Arzneimittelsicherheit. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98 (33):A -2076 / B-1760 / C-1656.

-
103. Manson JM, Freyssinges C, Ducrocq MB, et al. Postmarketing surveillance of lovastatin and simvastatin exposure during pregnancy. *Reprod Toxicol* 1996;10:439-446.
 104. Schmidmaier G, Wildemann B, Schwabe P, et al. A new electrochemically graded hydroxyapatite coating for osteosynthetic implants promotes implant osteointegration in a rat model. *J Biomed Mater Res* 2002;63:168-172.
 105. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1636-1641.
 106. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
 107. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, et al. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 2000;85:962-968.
 108. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, et al. Statin therapy is associated with reduced restenosis rates after coronary stent implantation in carriers of the PI(A2)allele of the platelet glycoprotein IIIa gene. *Eur Heart J* 2001;22:587-595.
 109. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:115-121.
 110. Leung BP, Sattar N, Crilly A, et al. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J Immunol* 2003;170:1524-1530.
 111. Abeles AM, Pillinger MH. Statins as antiinflammatory and immunomodulatory agents: a future in rheumatologic therapy? *Arthritis Rheum* 2006;54:393-407.
 112. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, et al. Osseointegration - communication of cells. *Clin Oral Implants Res*.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Schema Statinwirkung auf den Knochen
- Abb. 2 Schema Cholesterinbiosynthese
- Abb. 3 Operationsschritte
- Abb. 4 Röntgenaufnahme in 2 Ebenen
- Abb. 5 Femur nach Sägen
- Abb. 6 Schema Einbettvorrichtung Biomechanik
- Abb. 7 Zwick-Prüfmaschine für den Push-Out-Test.
- Abb. 8 Messkurve Push-out Test
- Abb. 9 Herstellung der Präparate
- Abb. 10 Längsschnitt Präparat mit einliegendem Implantat. Darstellung der Region of Interest ROI (13,7mm vom Knochenende in Richtung Epiphyse ziehend)
- Abb. 11 Darstellung Messung der direkten Knochen-Implantatkontakte (Grün = direkte Knochen-Implantatkontakte, rot = indirekten Kontaktfläche, blau = ROI Bone Area)
- Abb. 12 Darstellung Messung der direkten Knochen-Implantatkontakte (inklusive Addieren der Einzellängen zu Gesamtlänge in mm (Rot))
- Abb. 13 Röntgen Femur lateral präoperativ und postoperativ der Tiernummern 31, 37 und 38 aus der Gruppe SIM High

- Links: Röntgen Femur rechts a.p. postoperativ: korrekter intramedullärer Sitz des Implantates;
Rechts: Röntgen Femur rechts a.p. 56. Tag postoperativ: hyperthrophe Knochen mit Osteolyse und Resorptionssaum
- Abb. 14 Rechtes Femur Tiernummer 38 aus der Gruppe SIM High: Hypertropher, osteolytischer Knochen mit regelhaft intramedullär einliegendem K-Draht ohne Zeichen der Lockerung
- Abb. 15 Biomechanische Ergebnisse der Fixierungskraft [Mpa] nach 56 Tagen Standzeit. Signifikant höhere Fixierungskraft der Kontrollgruppe und der PDLLA-Gruppe gegenüber der SIM-High Gruppe.
- Abb. 16 Histologisches Ergebnis des gesamten Knochen-Implantat Kontaktes. Es zeigen sich signifikant größerer Knochen-Implantatkontakt der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe gegenüber der SIM-High Gruppe.
- Abb. 17 Histologisches Ergebnis für den direkten Knochen-Implantat Kontakt. Es zeigen sich signifikant größere Knochen-Implantatkontakte der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe gegenüber der SIM-High Gruppe.
- Abb. 18 Histologisches Ergebnis des indirekten Knochen-Implantat Kontaktes.
Es zeigen sich signifikant größere Knochen-Implantatkontakte der PDLLA-Gruppe gegenüber der SIM-High Gruppe
- Abb. 19 Histologisches Ergebnis der Bone Area.
Es zeigen sich signifikant größere trabekuläre Knochenanteile in der Bone Area der Kontroll-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen und der PDLLA-Gruppe gegenüber der SIM-High Gruppe.

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Phasen der Knochenheilung
Tab. 2	Gruppeneinteilung und Versuchsplan
Tab. 3	Beschichtungen
Tab. 4	Färbearbeitung
Tab. 5	Mittelwerte & Standardabweichungen initialer Push-Out und Fixierungskraft

10 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillatum
BA	Bone Area
BMP	Bone-morphogenetic-Protein
BQS	Bundesinstitut für Qualitätssicherung
CSE	Cholesterinsyntheseenzymhemmer
FIP	Kraft für initialen Push-Out
HAP	Hydroxylapatit
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
IGF	Insulin Like Growth Factor
K-Draht	Kirschner-Draht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low density lipoprotein
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PLA	Poly-lactid acid
PDLLA	Poly-DL-Laktid
PGA	Poly-glycolic acid
ROI	Region of interest
SIM	Simvastatin
TGF	Transforming Growth Factor
TNR	Tiernummer
μCT	Mikro-Computer-Tomographie
WHO	World Health Organisation

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Käßpler, Kathrin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Integration von Simvastatin beschichteten Implantaten am Rattenmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 24. April 2015

Unterschrift

Publikation

Kathrin Käßpler hatte an der Publikation:

Pauly S, Back DA, Kaeppler K, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. BMC Musculoskelet Disord;13:208

folgenden Anteil:

Methodik: Versuchsvorbereitung (Gruppeneinteilung, Tierpflege, Op-Vorbereitung, Narkose, Anfertigung Röntgenbilder, Nachsorge, Schmerztherapie, klinische Untersuchung), Knochenentnahme, histologische Untersuchung (Präparatherstellung, Anfärbung, mikroskopische Präparatanalyse), biomechanische Testung (Versuchsaufbau Zwick-Maschine, Einbettung Präparate, Versuchsdurchführung, Auswertung Ergebnisse);

Ergebnisse: Statistische Datenauswertung (SPSS), Interpretation, graphische Darstellung;

Datum: 24. April 2015

Unterschrift

12 Lebenslauf

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

13 Publikation

Pauly S, Back DA, Kaepler K, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskeletal Disord*;13:208

Pauly et al. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, **13**:208
<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/13/208>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Influence of Statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration

Stephan Pauly^{1*}, David A Back^{1,3†}, Kathrin Kaepler^{1,4}, Norbert P Haas¹, Gerhard Schmidmaier⁴ and Britt Wildemann^{1,2}

Abstract

Background: Simvastatin increases the expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in osteoblasts, therefore it is important to investigate the influence of statins on bone formation, fracture healing and implant integration. The aim of the present study was to investigate the effect of Simvastatin, locally applied from intramedullary coated and bioactive implants, on bone integration using biomechanical and histomorphometrical analyses.

Methods: Eighty rats received retrograde nailing of the femur with titanium implants: uncoated vs. polymer-only (poly(D,L-lactide)) vs. polymer plus drug coated (either Simvastatin low- or high dosed; "SIM low/ high"). Femurs were harvested after 56 days for radiographic and histomorphometric or biomechanical analysis (push-out).

Results: *Radiographic* analysis revealed no pathological findings for animals of the control and SIM low dose group. However, n=2/10 animals of the SIM high group showed osteolysis next to the implant without evidence of bacterial infection determined by microbiological analysis. *Biomechanical* results showed a significant decrease in fixation strength for SIM high coated implants vs. the control groups (uncoated and PDLLA). *Histomorphometry* revealed a significantly reduced total as well as direct bone/implant contact for SIM high- implants vs. controls (uncoated and PDLLA-groups). Total contact was reduced for SIM low vs. uncoated controls. Significantly reduced new bone formation was measured around SIM high coated implants vs. both control groups.

Conclusions: This animal study suggests impaired implant integration with local application of Simvastatin from intramedullary titanium implants after 8 weeks when compared to uncoated or carrier-only coated controls.

Keywords: Statins, Simvastatin, Implant integration, BMP, Local application

Background

The increasing number of primary and revision surgeries following orthopaedic implant application suggests the need for a durable osseous integration. Optimal osseointegration depends on the formation of new bone around orthopaedic implants, which may be stimulated by osteoinductive agents.

One safe [1] and promising substance group for this aim are the statins, where were primarily developed to inhibit cholesterol biosynthesis [2] and reduce its plasma levels [3]. Besides other pleiotropic effects [4,5], Simvastatin furthermore stimulates bone formation in a human

osteoblast cell line (MG-63) via increased expression of bone morphogenetic protein (BMP-2) [6]. BMP-2 is one of the most potent growth factors targeting bone formation in vivo [7], which stimulates osteoblast differentiation and -proliferation [8-10].

With systemic [11-14] or local delivery of statins to the bone from biodegradable carriers or percutaneous application forms, bone formation and fracture healing were improved in several experimental investigations [15-22].

Statins were also shown to improve implant integration following arthroplastic surgery. Although there have been multiple studies using systemic administration [11,23-25], only a few studies have investigated local application of statin-containing gels or microspheres and their effect on implant-bone integration [26-28]. In summary, combining the bone anabolic effect of Simvastatin with other local

* Correspondence: stephan.pauly@charite.de
[†]Equal contributors

¹Julius Wolff Institut, Center for Musculoskeletal Surgery, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany
 Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 Pauly et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

14 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Norbert P. Haas, Direktor der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin und Herrn Univ.-Prof. Dr. Dipl.-Ing. Georg Duda, Leiter des Julius Wolff Instituts Berlin, für die Möglichkeit, meine Dissertation in diesem Haus durchführen zu dürfen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Stefan Greiner, Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann und Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier für die fachliche Betreuung und Unterstützung bei dem Gelingen meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. David Alexander Back und Lisa Rommel für die Unterstützung, Motivation und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei der Auswertung der Biomechanik habe ich sehr hilfreiche Anleitung und Unterstützung durch die Mitarbeiter des Julius Wolff Instituts, Herrn Dipl.-Ing. Jan Hoffmann und Herrn Alexander Schill erhalten, herzlichen Dank hierfür. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Mario Thiele, der mir bei Fragen rund um Datenverarbeitung und graphische Darstellung mit Rat und Tat zu Seite stand. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Peter Schlattmann für die Methodikberatung der statistischen Auswertung.

Mein ausgesprochener Dank gilt meiner Familie, die mich zu jeder Zeit bei dem Gelingen dieser Arbeit unterstützt hat.