

Aus dem  
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
Klinik für Orthopädie und Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert P. Haas

## **Habilitationsschrift**

### **Experimentelle Untersuchungen zur Prophylaxe und Therapieoptimierung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Philipp Schwabe**

**geboren am 13.08.1977**

**in Berlin**

Eingereicht: Dezember/2014  
Dekanin: Professor Dr. med. Annette Grütters-Kieslich  
1. Gutachter: Professor Dr. med. Thomas Mittlmeier  
2. Gutachter: Professor Dr. med. Cyrus Klostermann

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis relevanter Abkürzungen.....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Inzidenz und Ätiologie von Tibiaschafffrakturen.....	5
1.2 Klassifikation von Tibiaschafffrakturen und korrespondierenden Weichteilschäden...	6
1.2.1 Klassifikation der Tibiaschafffraktur .....	6
1.2.2 Klassifikation des geschlossenen Weichteilschadens .....	7
1.2.3 Klassifikation des offenen Weichteilschadens .....	8
1.3 Pseudarthrosen nach Behandlung von Tibiaschafffrakturen .....	9
1.4 Klassifikation von Pseudarthrosen .....	12
1.4.1 Biologisch reaktionsfähige, vitale Pseudarthrosen .....	12
1.4.2 Biologisch nicht reaktionsfähige, avitale Pseudarthrosen.....	13
1.5 Ätiologie von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes .....	15
1.5.1 Systemische Faktoren .....	15
1.5.2 Lokale Faktoren .....	15
1.6 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	18
1.7 Klinische Anwendung von BMPs .....	20
1.8 Bisphosphonate .....	22
1.9 Lokale Applikationsmethoden .....	24
<b>2 Wissenschaftliche Fragestellungen .....</b>	<b>26</b>
<b>3 Klinische Ergebnisse nach Behandlung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes .....</b>	<b>28</b>
3.1 Funktionelles Outcome und Lebensqualität im Langzeitverlauf nach erfolgreicher Therapie von tibialen Pseudarthrosen.....	28
<b>4 Experimentelle Konzepte zur Prophylaxe und Therapieoptimierung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes.....</b>	<b>30</b>
4.1 Untersuchung der Biokompatibilität einer biodegradierbaren Poly(D,L-laktid) Beschichtung für orthopädische Implantate .....	30
4.2 Effekt eines neuen, nicht-viralen Gentransfers von BMP-2 auf die Knochenheilung .....	32
4.3 Darstellung der Histologie und Bestimmung von Wachstumsfaktorkonzentrationen in humanem Pseudarthrosengewebe .....	34
4.4 Einfluss der lokalen Applikation von Zolendronat in einer Poly(D,L-laktid) Implantatbeschichtung auf die Frakturheilung.....	36

4.5 Analyse der Freisetzungskinetiken von verschiedenen Antibiotika nach Kombination mit Knochenersatzmaterial (Demineralisierter Knochenmatrix) .....	38
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>40</b>
5.1 Klinische Untersuchungen .....	40
5.2 Lokale Applikation von BMPs.....	43
5.3 Gentherapie .....	45
5.4 Alternative Therapieansätze .....	49
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>75</b>
8.1 Danksagung .....	75
8.2 Eidesstattliche Erklärung.....	77

## **Verzeichnis relevanter Abkürzungen**

AO – Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen

AOFAS – American Orthopaedic Foot and Ankle Society

BAMBI – BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor

BMP – Bone Morphogenetic Protein

BMPR – Bone Morphogenetic Protein Receptor

COPROG – Copolymer Protected Gene Vector

DBM – Demineralisierte Knochenmatrix

FPPS – Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase

IGF – Insulin Like Growth Factor

IL-6 – Interleukin 6

NUSS – Non Union Scoring System

OP-1 – Osteogenic Protein-1

OPG – Osteoprotegerin

PDGF – Platelet Derived Growth Factor

PDLLA – Poly(D,L-lactide)

RANKL – Receptor Activator of Nuclear Factor-  $\kappa$ B Ligand

rhBMP – rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein

SF-12 PCS – Short Form 12 Physical Component Score

SF-12 MCS – Short Form 12 Mental Component Score

SF-36 – Short Form 36

Ski – Sloan klettering retrovirus oncogene homologue

Smad – Sma = small body size; mad = mothers against decapentaplegic

Smurf – Smad ubiquitin regulatory factor

TGF- $\beta$  – Transforming Growth Factor- $\beta$

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

ZOL – Zolendronat

# 1 Einleitung

## 1.1 Inzidenz und Ätiologie von Tibiaschaftfrakturen

Frakturen des Tibiaschaftes zählen zu den häufigsten Frakturen im Bereich der langen Röhrenknochen<sup>1,2</sup>. Isolierte Frakturen sind eher selten. Tibiaschaftfrakturen stellen in der Regel die Hauptkomponente von Unterschenkelfrakturen dar und für den nordamerikanischen Raum beläuft sich die Anzahl auf 492.000 pro Jahr<sup>3</sup>. Die jährliche Inzidenz wird in aktuellen epidemiologischen Studien mit 14,3-16,1 Frakturen/ 100.000 Einwohner angegeben<sup>4, 5</sup>. Insgesamt ist das männliche Geschlecht doppelt so häufig betroffen wie das weibliche<sup>6, 7</sup>. Während in der jüngeren Population vor allem Hochrasanztraumata (z.B. Verkehrsunfälle und Sportverletzungen) ursächlich sind, führen in der älteren Generation vor allem Niedrigrasanztraumata im Sinne von Stürzen auf gerader Ebene zur Fraktur. Dies führt schließlich zu einer bi-modalen Verteilung der Inzidenzen<sup>7</sup> (Abbildung 1).

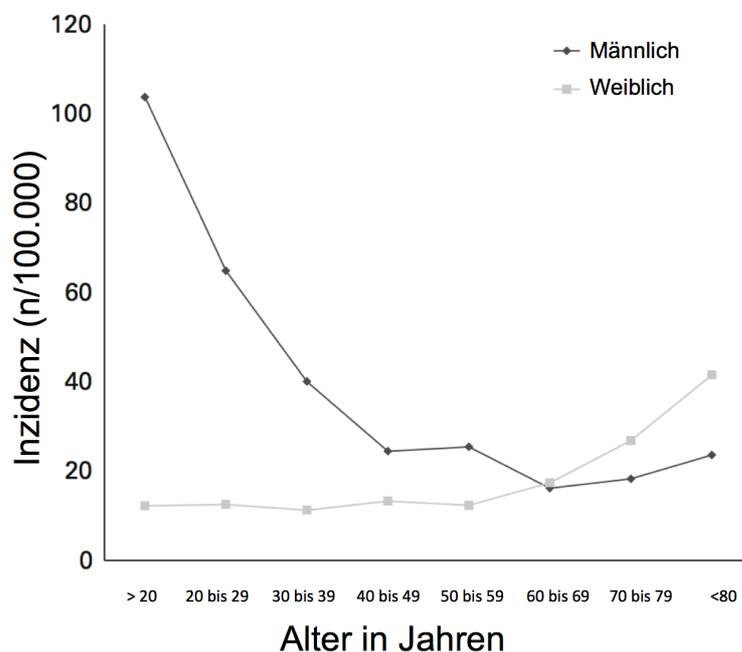


Abb. 1: Bi-modale Verteilung der Inzidenz von Tibiaschaftfrakturen mit höherer Inzidenz für männliche, junge Patienten und weibliche, ältere Patientinnen. (Modifiziert nach Connelly et al., 2014<sup>7</sup>)

Weiterhin hat es in den letzten 20 Jahren einen deutlichen Wandel bezüglich des Unfallmechanismus gegeben. Während 1990 noch Verkehrsunfälle (38%) und

Sportverletzungen (31%) führend waren, sind in 2008 mit 32% die Stürze auf ebenem Grund, gefolgt von Sportverletzungen (27%) und Verkehrsunfällen (21%) am häufigsten <sup>5</sup>. Innovationen im Bereich der Verkehrssicherheit <sup>5</sup> und der demographische Wandel mit der Zunahme des älteren, weiblichen Patientengutes (>65 Jahre) werden als ursächlich angesehen <sup>8, 9</sup>. Insgesamt hat sich auch das mittlere Alter der Patienten mit Tibiaschaftfrakturen in den letzten zwei Dekaden auf 40 Jahre erhöht <sup>5</sup>.

Aufgrund des spärlichen Weichteilmantels, vor allem im Bereich der antero-medialen Tibiakante, kommt es häufig zu ausgedehnten Weichteilschäden mit einem Anteil an offenen Frakturen in bis zu 24% der Fälle <sup>6, 10</sup>. Bei solitärer Betrachtung des älteren Patientenguts (>65 Jahre) steigt diese Rate auf über 30% <sup>11</sup>. Insgesamt gehen die Komplexität und der begleitende Weichteilschaden bei offenen Frakturen miteinander einher. Auswertungen von epidemiologischen Daten zeigen, dass offene Unterschenkelfrakturen mit 45% den größten Anteil aller offenen Frakturen im Bereich der langen Röhrenknochen ausmachen <sup>12</sup>. Für offene Tibiaschaftfrakturen stellen Verkehrsunfälle (62%), Stürze auf ebenem Grund (12%), Stürze aus großer Höhe (8,7%) und Sportverletzungen (7,4%) die häufigsten Ursachen dar <sup>12</sup>.

## **1.2 Klassifikation von Tibiaschaftfrakturen und korrespondierenden Weichteilschäden**

### *1.2.1 Klassifikation der Tibiaschaftfraktur*

Tibiaschaftfrakturen werden nach der von Müller *et al.* eingeführten AO-Klassifikation (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen) eingeteilt <sup>13</sup> (Abbildung 2). In diesem System werden die Frakturen in einfache, Keil- und komplexe Frakturen unterteilt. Die einfachen Frakturen (Typ A) werden weiter in die spiralförmigen, die schräg- und die querverlaufenden Brüche untergliedert. Bei den Typ B Verletzungen unterscheidet man die Torsionskeile, die Biegungskeile sowie die fragmentierten Biegungskeile. Die Typ C Frakturen untergliedert man in komplexe spiralförmige Frakturformen, die Segmentfrakturen und die Trümmerfrakturen. Dieses Klassifikationssystem beinhaltet insgesamt 27 verschiedene Frakturformen der Tibiaschaftfraktur und ist bereits auf seine Zuverlässigkeit hin validiert worden <sup>14</sup>.

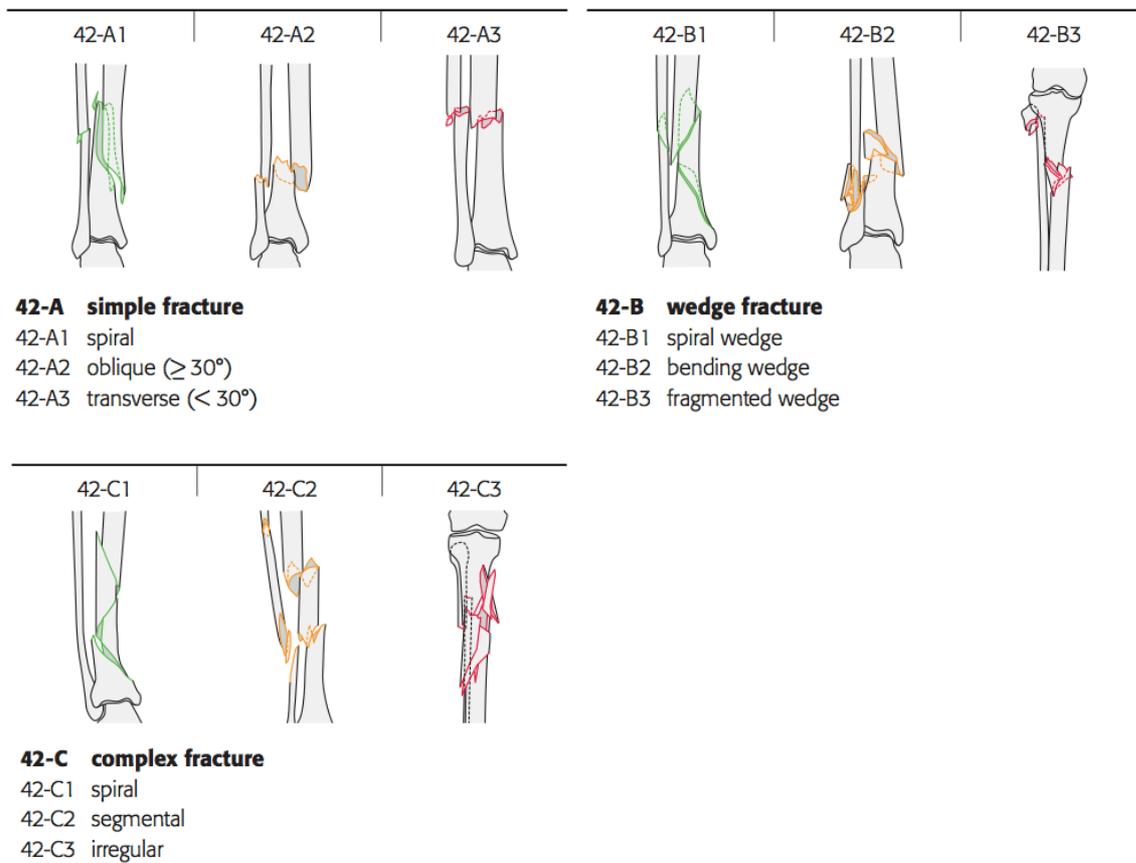


Abbildung 2: AO-Klassifikation der Tibiaschaftfraktur. (Aus: Müller AO Classification of Fractures – Long Bones; AO Trauma; AO Foundation Switzerland; <https://www.aofoundation.org>)

### 1.2.2 Klassifikation des geschlossenen Weichteilschadens

Neben der Frakturklassifikation ist die Beurteilung und Gradierung des zugrunde liegenden Weichteilschadens von eminenter Bedeutung, da dieser letztlich das therapeutische Vorgehen, das Behandlungsergebnis und die Prognose maßgeblich beeinflusst.

Geschlossene Weichteilschäden werden nach Tscherner und Oestern in vier Grade unterteilt<sup>15</sup>. Grad 0 entspricht einem minimalen, bzw. unbedeutenden Weichteilschaden bei einfacher Frakturform nach indirektem Trauma oder im Rahmen pathologischer Frakturen. Weichteilverletzungen vom Grad 1 resultieren von einem leichten bis mittelmäßigem Trauma und beinhalten oberflächliche Schürfwunden und leichte Kontusionen bei einfachen bis mittelschweren Frakturformen. Beim Grad 2 liegen tiefreichende Kontusionen oder Schürfwunden vor, welche durch ein direktes Trauma verursacht worden sind. Es besteht ein

drohendes Kompartmentsyndrom und es liegen mittelschwere bis schwere Frakturformen vor. Ein Weichteilschaden vom Grad 3 entspricht einer ausgedehnten Hautkontusion oder -quetschung bei korrespondierend schwerer Frakturform und Muskelläsion nach direktem Trauma. Das manifeste Kompartmentsyndrom und die Verletzung eines Hauptgefäßes entsprechen ebenfalls dem Grad 3.

### *1.2.3 Klassifikation des offenen Weichteilschadens*

Obgleich die Klassifikation von Tscherny und Oestern auch offene Frakturen beinhaltet, hat sich international die Klassifikation von Gustilo und Anderson aus dem Jahr 1976 zur Einteilung von Frakturen mit offenem Weichteilschaden durchgesetzt<sup>16</sup>. Die Unterteilung erfolgt in drei Grade, wobei der Grad III in drei weitere Subgruppen (A, B, C) untergliedert wird<sup>17</sup>. Ein offener Weichteilschaden Grad I entspricht einer Hautläsion <1cm bei allenfalls geringer Kontamination und einfacher Frakturform (in der Regel Durchspießung des Knochens). Grad II beinhaltet eine Hautlazeration von >1cm mit geringer bis moderater Weichteilquetschung und Kontamination. Die begleitende Fraktur ist einfacher Natur ohne ausgeprägte Trümmersituation. Beim Grad III handelt es sich um offene Frakturen mit schwerstem Weichteilschaden unter Einbeziehung von Haut, Muskeln und neurovaskulären Strukturen, sowie komplexen Frakturmustern. Zu Grunde liegen häufig schwere Quetschverletzungen. Unabhängig von der Größe der Hautlazeration besteht beim Grad IIIA noch eine adäquate Weichteildeckung des Knochens. Der Grad IIIB beschreibt in diesem Zusammenhang eine massive Weichteilschädigung, bzw. einen Verlust von Weichteilen bei gleichzeitig freiliegenden und deperiostierten Knochenanteilen. In der Regel besteht zusätzlich eine massive Kontamination der Wunde. Beim Grad IIIC liegt zusätzlich eine rekonstruktionspflichtige arterielle Verletzung vor. Obwohl zumindest in erst- und zweitgradig offenen Frakturen das Ausmaß der Hautläsion, welche in direkter Verbindung zur Frakturzone steht, als Klassifizierungsmerkmal dient, können Großteile des Weichteilschadens auch unter der intakten, aber gequetschten Haut verborgen liegen. Daher wird das wahre Ausmaß des Weichteilschadens bei der initialen Untersuchung oft unterschätzt. Der intraoperative Befund im Rahmen der primären operativen Versorgung offenbart häufig einen höheren Weichteilschaden als präoperativ eingestuft. Daher sollte die exakte Klassifizierung erst intraoperativ erfolgen<sup>18</sup>.

### 1.3 Pseudarthrosen nach Behandlung von Tibiaschaftfrakturen

Trotz technischer Neu- und Weiterentwicklungen von Implantaten, sowie Fortschritten in den Operationstechniken stellt eine gestörte Frakturheilung ein typisches Problem bei der Behandlung von Frakturen dar und wird in der Literatur für 5-10% der Frakturen angegeben <sup>19</sup>.

Während im deutschen Sprachgebrauch eine Pseudarthrose mit einer Non-union gleichgesetzt wird, bedeutet im angloamerikanischen Raum die Pseudarthrose das „Endstadium“ einer „chronischen“ Non-union mit der Ausbildung eines „echten“ synovialen Falschgelenkes, bei welchem die zwei Knochenenden über eine fibrocartilaginäre, Synovialflüssigkeit produzierende Höhle verbunden sind <sup>20</sup>. Im Weiteren wird entsprechend des hierzulande üblichen Sprachgebrauchs die Pseudarthrose synonym mit der Non-union verwendet.

Entsprechend der historischen Einteilung bezeichnet eine verzögerte Frakturheilung („Delayed-union“) ein Ausbleiben der Heilung nach einem Zeitraum von 4-6 Monaten und eine Pseudarthrose („Non-union“) eine fehlende knöcherner Heilung von mehr als 6 Monaten nach stattgehabtem Trauma <sup>21, 22</sup>. Zu Studienzwecken definierte die American Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 1988 eine Non-union als eine mehr als 9 Monate alte Fraktur ohne Zeichen einer Konsolidierung über 3 konsekutive Monate <sup>20</sup>. Aufgrund der multiplen assoziierten Faktoren, die letztlich zur Entstehung einer Pseudarthrose führen, bzw. diese beeinflussen, hat sich diese starre Einteilung als nicht universell einsetzbar und damit nicht als praktikabel erwiesen. Aufgrund dieser Variabilität finden sich in der Literatur, ausgehend von der initialen Einteilung, eine Vielzahl von uneinheitlichen Definitionen für eine verzögerte oder ausgebliebene Frakturheilung <sup>23, 24</sup>. Eine vom Zeitfaktor losgelöste Definition wird von Brinker et al. vorgeschlagen <sup>25</sup>: „Eine Delayed-union wird definiert als ein Zustand nach einer Fraktur, bei welchem nach Meinung des Behandlers ein langsamerer Heilungsfortschritt vorliegt als ursprünglich erwartet und bei dem ohne weitere Intervention das Risiko zum Übergang in eine Non-union besteht. Eine Non-union besteht dann, wenn nach Meinung des behandelnden Chirurgen keine klinischen oder radiologischen Heilungsfortschritte zu verzeichnen sind und keine oder nur eine geringe Chance besteht, dass eine Heilung ohne weitere Interventionen zu erzielen ist.“ Eine ähnliche Definition mit zusätzlicher Einbeziehung des Patientenalters wurde von McKee et al. im Manual der AO (Arbeitsgemeinschaft

für Osteosynthesefragen) angegeben <sup>26</sup>. Da jedoch in jedem Fall die Abschätzung der Frakturheilung, bzw. dessen Fortschritt von der Bewertung des behandelnden Chirurgen abhängt, bleibt diese Einschätzung am Ende immer subjektiv. Bestätigt wird dies durch eine Umfrage an 577 Chirurgen bezüglich der Einschätzung der Frakturheilung, bzw. Fehlheilung von Tibiaschaftfrakturen <sup>24</sup>. Bei insgesamt 444 Rückläufern aus dieser Befragung reichten die Definitionen einer Delayed-union von 1-8 Monate ( $3,5 \pm 1,4$ ) und die der Non-union von 2-12 Monate ( $6,3 \pm 2,1$ ). Interessanterweise hatten Faktoren wie z.B. das Alter der Chirurgen, die akademische Vor- und Weiterbildung oder der Anteil an Traumapatienten im Bereich der jeweiligen Wirkungsstätte keinen Einfluss auf die jeweilige Definition <sup>24</sup>. Grundsätzlich ist dies von enormer klinischer Bedeutung, denn entsprechend der Einschätzung resultiert aus der jeweils gestellten Diagnose in der Regel ein operativer Revisionseingriff. Mit dem Ziel eine bessere interindividuelle Vergleichbarkeit der Fälle und ein besseres Verständnis der Pathologie mit Ausrichtung auf objektivierbare Therapiealgorithmen zu erreichen, ist von Calori et al. ein sehr ausführliches Non-Union Scoring System (NUSS) vorgestellt worden. Zur Einschätzung der Frakturheilung/ Pseudarthrosenentwicklung werden letztlich multiple (bis zu acht), zu drei Hauptfaktoren (Knochen, Weichteile und Patient) assoziierte, Variablen einbezogen <sup>27</sup>.

Bedingt durch die zarten Weichteilverhältnisse, vor allem im Bereich der medialen Tibiakante und dem distalen Unterschenkel, wo der Knochen langstreckig nur von Haut bedeckt ist, können Frakturen zu kritischen Perfusionsverhältnissen sowohl der betroffenen Fragmente als auch der umliegenden, meist nur fasziokutanen Weichteile, führen. Dies birgt ein hohes Risiko für posttraumatische Knochen- und Weichteilinfektionen, sowie für die Ausbildung von Pseudarthrosen <sup>28, 29</sup>. Die Inzidenz von Pseudarthrosen nach Behandlung von Tibiaschaftfrakturen wird in der Literatur inhomogen dargestellt. Das liegt darin begründet, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Einschlusskriterien und heterogene Verletzungsmuster bezüglich des initialen Traumas (AO-Frakturtyp, offene oder geschlossene Fraktur, Ausmaß des Weichteilschadens) und der anschließenden Versorgung angegeben wurden. Fong et al. zum Beispiel berichten in einer aktuellen Studie nach operativer Therapie von offenen und geschlossenen Tibiaschaftfrakturen von einer Pseudarthrosenrate von 18,2% <sup>30</sup>. Eingeschlossen waren hier Patienten mit überwiegend (fast 80%) geschlossenen Frakturen. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer großen

Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2000 von Coles et al.. Hier konnte bei geschlossenen Tibiaschaftfrakturen eine verzögerte, bzw. ausgebliebene Frakturheilung in 2,6% nach Plattenosteosynthese, in 8% nach aufgebohrter, in 16,7% nach unaufgebohrter Marknagelung und in 17,2% nach konservativer Therapie gezeigt werden <sup>31</sup> (Abbildung 3).

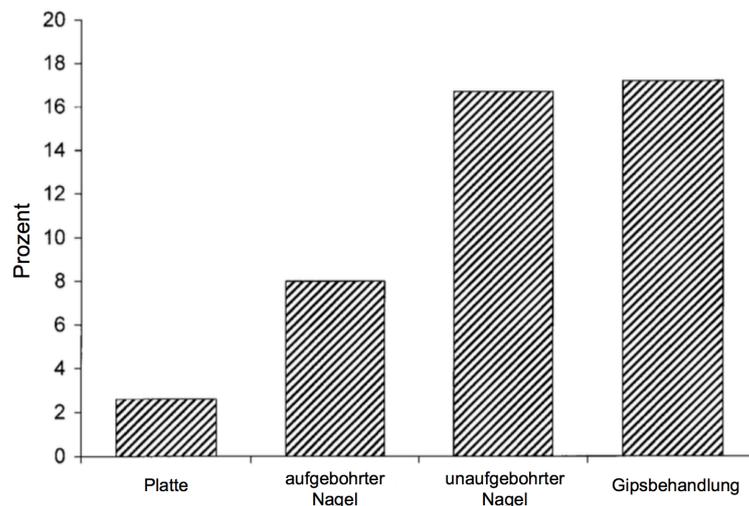


Abbildung 3: Darstellung der verzögerten / ausgebliebenen Frakturheilung nach Behandlung von geschlossenen Tibiaschaftfrakturen. (Modifiziert nach Coles et. al., 2000 <sup>31</sup>)

Während sich in einigen Studien die Rate an Pseudarthrosen auch nach offenen Frakturen im gleichen Niveau bewegt <sup>32, 33</sup>, berichten andere Autoren über die Notwendigkeit von Revisionseingriffen bei jedem zweiten Patienten mit offener Fraktur (Dynamisierung, Knochentransplantation, Implantatwechsel), um eine Ausheilung zu erreichen <sup>34</sup>. Insbesondere offene Frakturen, bei denen das Ausmaß der Weichteilverletzung direkt mit der Energie des stattgehabten Traumas korreliert, scheinen prädisponiert für Heilungsstörungen zu sein <sup>35</sup>. In einer Untersuchung von 243 Pseudarthrosen des Tibiaschaftes entwickelten sich diese in knapp 50% der Fälle auf dem Boden einer offenen Fraktur <sup>36</sup>. In einer Meta-Analyse von Bhandari et al. mit reinem Fokus auf offene Frakturen wird eine deutlich höhere Rate an Reoperationen beschrieben <sup>37</sup>. Entsprechend wurden in einer weiteren Übersichtsarbeit von Papakostidis et al. Pseudarthrosenraten von bis zu 54% bei höhergradig offenen Frakturen (Gustilo/Anderson IIIB) vorgestellt <sup>38</sup>. Auch die Komplexität der Fraktur ist ein entscheidender Faktor im Rahmen der

Risikoabschätzung. Bei komplexen, segmentalen Frakturen, unabhängig vom begleitenden Weichteilschaden, steigt die Pseudarthroseninzidenz auf 50%<sup>39</sup>. Vaskuläre Begleitverletzungen sind ebenfalls begünstigend für eine verzögerte Knochenbruchheilung. In diesen Fällen kann die Rate bis auf 46% ansteigen<sup>40</sup>.

#### 1.4 Klassifikation von Pseudarthrosen

Ähnlich den Definitionen von verzögerter und ausbleibender Knochenheilung sind von verschiedenen Autoren Klassifikationen für Pseudarthrosen vorgestellt worden<sup>23, 26, 41</sup>. Letztlich stützen sich all diese auf den von Weber und Cech aufgestellten Prinzipien aus dem Jahr 1976<sup>22</sup>.

Die Klassifikation von Weber und Cech basiert auf der Vitalität und dem Heilungspotenzial der verschiedenen Pseudarthrosearten. Bei aseptischen Pseudarthrosen werden letztlich zwei Arten unterschieden<sup>22</sup>.

##### 1.4.1 Biologisch reaktionsfähige, vitale Pseudarthrosen

Diese können sich in drei klinischen Manifestationen präsentieren (Abbildung 4):

Typ A: Hypertroph, mit Bildung von viel Kallus, Elefantenfußpseudarthrose

Typ B: Mäßig hypertroph, mit wenig Kallusbildung, Pferdefußpseudarthrose

Typ C: Oligotroph, ohne Kallusbildung

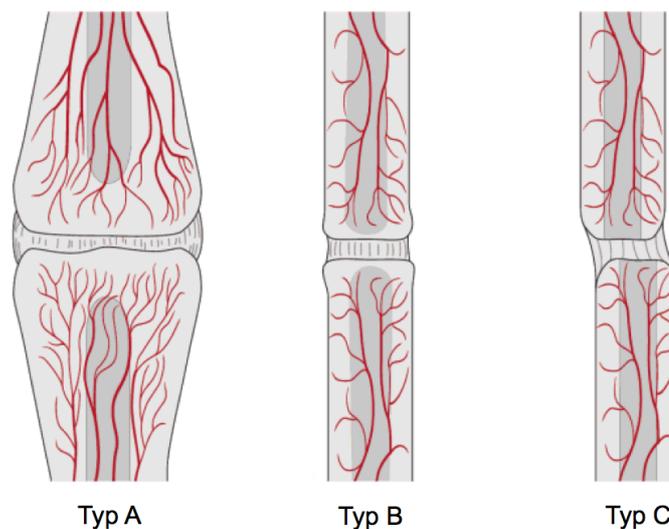


Abbildung 4: Einteilung der reaktionsfähigen, vitalen Pseudarthrosen. (Modifiziert nach Cech 2011<sup>42</sup>)

Das biologische Heilungspotenzial der vitalen Pseudarthrosen ist gut. Durchgeführte Knochenszintigraphien belegen, dass die Durchblutung der jeweiligen Knochenenden unproblematisch ist<sup>20</sup>. Eine spontane Heilung kann in diesem Fall aufgrund ungünstiger biomechanischer Bedingungen, welche aus einer inadäquaten Immobilisierung und/oder Stabilisierung der Fraktur resultieren, nicht stattfinden. Das Therapiekonzept besteht hier in der adäquaten osteosynthetischen Stabilisierung der Fraktur. Die Pseudarthrosezone muss nicht direkt adressiert werden.

#### 1.4.2 Biologisch nicht reaktionsfähige, avitale Pseudarthrosen

Hierfür werden vier klinische Subtypen beschrieben (Abbildung 5):

Typ A: Drehkeil-Pseudarthrose, dystroph mit partieller Nekrose

Typ B: Trümmerzonenpseudarthrose mit totaler Nekrose

Typ C: Defekt-Pseudarthrose

Typ D: Atrophe Pseudarthrose

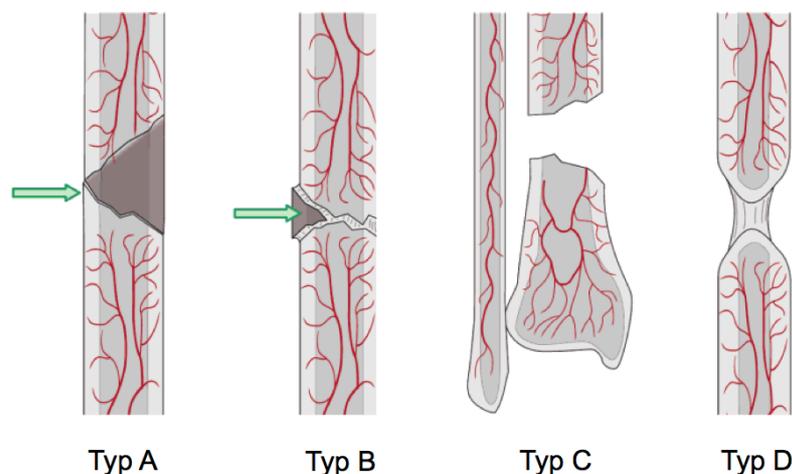


Abbildung 5: Einteilung der nicht reaktionsfähigen, avitalen Pseudarthrosen. (Modifiziert nach Cech 2011<sup>42</sup>)

Die avitalen Pseudarthrosen sind charakterisiert durch die Abwesenheit von Kallusgewebe und einer avaskulären Umgebung. Knochenszintigraphien aus diesen Pseudarthrosebereichen belegen die fehlende Blutversorgung in den Knochenenden<sup>20</sup>. Die Knochenenden sind durch den langwierigen Reparaturprozess sklerotisch oder osteopen aufgrund der Inaktivität. Knochenfragmente können nach initialen

Traumata entweder fehlen oder wegen der mangelnden Durchblutung und/oder eines Infektionsgeschehens nekrotisch sein. Als Therapie reicht für die avitalen Pseudarthrosen eine rein mechanische Lösung im Sinne einer adäquaten Stabilisierung nicht aus. Vielmehr müssen hier ein ausführliches Debridement des nekrotischen Knochens und eine additive biologische Stimulation durch die Anlagerung von osteoinduktivem Knochenmaterial erfolgen, wobei die autologe Spongiosaplastik hierfür aktuell den Goldstandard darstellt <sup>20, 43-45</sup>.

Infektpseudarthrosen stellen die komplexeste und schwerwiegendste Form der Pseudarthrosen dar und kommen in bis zu 18% der Fälle vor <sup>36</sup>. Sie sind typischerweise mit ausgeprägten Schmerzen, Fehlstellungen und Weichteilproblemen/-defekten assoziiert. Nicht selten besteht eine zusätzliche Markraumphlegmone mit Sequesterbildung und/oder Fistel in die Weichteile. Die Behandlung ist aufwendig und beinhaltet als Therapieziel neben der Stabilisierung des Knochens, der Wiederherstellung der Funktion und der Rekonstruktion der Weichteile zusätzlich die Infektsanierung <sup>25</sup>. Der klinische Verlauf ist schwer vorherzusagen. Morphologisch können sich Infektpseudarthrosen als hypertrophe oder atrophe Varianten präsentieren <sup>46</sup>. Die Therapie beinhaltet immer die konsequente und radikale Resektion des infizierten Weichteil- und Knochengewebes, die Entfernung des einliegenden Osteosynthesematerials, sowie eine gezielte antibiotische Langzeittherapie <sup>47-49</sup>. Je nach notwendiger Weichteilresektion müssen im Verlauf der Therapie plastisch-chirurgische Weichteildeckungskonzepte, entsprechend der rekonstruktiven Sequenz (rekonstruktives Uhrwerk), zum Einsatz kommen <sup>50</sup>. Die Knochendefektrekonstruktion findet im Rahmen eines mehrstufigen Konzeptes statt. Nach erfolgreicher Sanierung des Infektes kommen bei kleinen Defekten entweder die autologe Spongiosaplastik oder bei größeren, segmentalen Defekten zum Beispiel vaskularisierte Knochentransfers oder Distraktionsosteogenesen via Segmenttransport (Ilizarov-Verfahren) in Betracht <sup>46, 51-54</sup>.

## 1.5 Ätiologie von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes

Das Verständnis der Ätiologie von Pseudarthrosen ist fundamentaler Bestandteil prognostischer und therapeutischer Überlegungen. Die Entstehung ist ein multifaktorieller Prozess, an welchem systemische und lokale Faktoren beteiligt sind.

### 1.5.1 Systemische Faktoren

Prädisponierende systemische Faktoren, welche die Frakturheilung negativ beeinflussen, bzw. zur Pseudarthrose führen können, sind ein fortgeschrittenes Patientenalter<sup>55</sup>, ein schlechter Ernährungszustand<sup>56, 57</sup>, ein Vitaminmangel<sup>58</sup>, sowie Alkohol-<sup>59-61</sup> und Nikotinabusus<sup>62, 63</sup>. Neben systemischen Begleiterkrankungen, wie z.B. dem Diabetes mellitus<sup>60, 64</sup>, einem Morbus Cushing<sup>65, 66</sup> oder der Einnahme von bestimmten Medikamenten, wie nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR)<sup>67, 68</sup> wird aktuell auch eine genetische Prädisposition als Risikofaktor für die Ausbildung von Pseudarthrosen diskutiert<sup>69-71</sup>.

### 1.5.2 Lokale Faktoren

Zu den lokalen Faktoren zählen diejenigen, die im direkten Zusammenhang mit dem Unfallereignis, der Fraktur und des korrespondierenden Weichteilschadens selbst oder deren Versorgung stehen.

#### 1.5.2.1 Biologisches Ungleichgewicht

Sowohl das Trauma, als auch iatrogene Schädigungen von Periost und Weichteilen während operativer Repositionsmanöver und intra- oder extramedullärer Implantatfixierungen können im Bereich der Tibia zu einer Perfusionsstörung und zur Beeinträchtigung zellulärer Heilungsprozesse führen. Hochrasanztraumata führen über die Schädigung von Knochen, Periost und der umliegenden Weichteile zu einer relevanten Verminderung der lokalen Durchblutung. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem Schweregrad der Fraktur, dem Ausmaß des Weichteilschadens und der Inzidenz von Pseudarthrosen<sup>35, 36, 38, 39, 72-74</sup>. Die reduzierte nutritive Perfusion und lokale Verfügbarkeit von osteogenen Zellen im Frakturbereich erhöht das Risiko von Knochennekrosen. Die Störung des physiologischen Heilungsprozesses, an welchem eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Wachstumsfaktoren beteiligt sind, kann für die Entwicklung einer Pseudarthrose ausschlaggebend sein<sup>75-77</sup>.

Das Kompartmentsyndrom stellt einen weiteren Risikofaktor bezogen auf die Störung der lokalen Durchblutung dar. Das kausal-pathogenetische Problem liegt dabei auf mikrozirkulatorischer Ebene <sup>78</sup>. Der Unterschenkel weist die höchste Inzidenz an Kompartmentsyndromen aller Extremitätensegmente auf, wobei in 36% der Fälle Tibiafrakturen ursächlich sind <sup>79</sup>. Die Inzidenz des posttraumatischen Kompartmentsyndroms wird bei Tibiafrakturen zwischen 1,4% - 48% angegeben <sup>80</sup>. <sup>81</sup>. Bei offenen Frakturen kann in bis zu 13% der Fälle ein Kompartmentsyndrom vorliegen <sup>34, 82</sup>. Einige Studien berichten auch über die Entwicklung eines intraoperativen Kompartmentsyndroms im Rahmen der operativen Versorgung durch Traktionsmanöver und Marknagelinsertion <sup>83, 84</sup>. Reverte et al. konnten eine signifikant höhere Rate an Pseudarthrosen bei Patienten mit Tibiafrakturen mit begleitendem Kompartmentsyndrom nachweisen <sup>85</sup>.

#### 1.5.2.2 Fehlender Fragmentkontakt

Ein verbliebener Frakturspalt kann das Resultat von eingeschlagenen Weichteilen, segmentalen Trümmersituationen, Defektfrakturen oder ungenügender Reposition im Rahmen der Versorgung sein. Bhandari et al. konnten bei Tibiaschaftfrakturen zeigen, dass das Vorliegen einer offenen Fraktur, eine querverlaufende Fraktur und ein postoperativ verbliebener Frakturspalt prädiktive Faktoren für die Entwicklung einer Pseudarthrose sind. In ihrer Studie lag die Reoperationsrate bei gleichzeitigem Vorhandensein aller drei Faktoren bei 90% <sup>86</sup>. Diese Einflussfaktoren wurden von Fong et al. validiert und es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine Kontinuität der Kortikalis unter 25% einen weiteren prädiktiven Faktor für die Ausbildung einer Pseudarthrose darstellt. Ferner erhöht ein Frakturspalt nach operativer Stabilisierung >3mm die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Pseudarthrose um das Vierfache <sup>87</sup>.

#### 1.5.2.3 Mechanische Instabilität

Eine mechanische Instabilität kann sowohl nach einer konservativen, als auch operativen Therapie (externe wie interne Fixation) resultieren. Als Ursachen stehen eine inadäquate osteosynthetische Stabilisierung, ein segmentaler Knochenverlust und/ oder eine unzureichende Implantatfixation im Knochen aufgrund schlechter Knochenqualität im Vordergrund. Durch ein Übermaß interfragmentärer Bewegung in der Heilungsphase wird die Elastizitätsreserve der neu gebildeten Faserknochenbälkchen überschritten. Der Mechanismus der spontanen

Knochenheilung wird unterbrochen und muss schließlich erneut beginnen<sup>75, 88</sup>. Die Folge ist bei erhaltener Vaskularisation meist eine überschießende Kallusbildung, eine Erweiterung des Frakturspaltes und eine ausbleibende Mineralisierung der gebildeten Knochenvorstufen mit der konsekutiven Ausbildung einer zumeist hypertrophen Pseudarthrose<sup>25, 75</sup>.

#### 1.5.2.4 Infektionen

Eine bakterielle Kontamination einer Tibiaschaftfraktur kann in absteigender Reihenfolge der Häufigkeit entweder die Folge einer offenen Weichteilverletzung, einer iatrogenen Keiminokulation im Rahmen der operativen Versorgung oder einer hämatogenen Streuung sein. Eine Infektion im Bereich der Fraktur oder in den umgebenden Weichteilen kann zu den gleichen lokalen Bedingungen führen, die auch bei nicht infizierten Frakturen die Ausbildung einer Pseudarthrose begünstigen<sup>25, 88, 89</sup> und erhöhen somit das Risiko ihrer Entstehung<sup>72</sup>. Außerdem kann aus der septischen Lockerung von Implantaten eine mechanische Instabilität resultieren. Die knöchernen Reparaturprozesse werden durch ein Infektgeschehen negativ beeinflusst. Aufgrund von ausgeprägten Resorptionsvorgängen, als körpereigener Versuch das infizierte Knochen- und Weichteilmaterial abzubauen, kommt es zur Osteolysebildung im Bereich der Frakturregion<sup>25, 88, 89</sup>. Dieses wiederum resultiert in einem verminderten Knochenkontakt sowie einer progredienten Instabilität. Diese Mechanismen führen schließlich zur Ausbildung einer septischen Pseudarthrose.

In Zusammenschau der vorliegenden klinischen Situationen und der genannten Parameter können letztlich prognostisch-kausale Schlüsselfaktoren extrahiert werden, die in ihrer Kombination die pathophysiologische Grundlage für die erfolgreiche Therapie einer gestörten Frakturheilung bilden können. Von Giannoudis et al. wurden diese Faktoren im sogenannten „Diamond Concept“ zusammengefasst<sup>90, 91</sup>. Es beinhaltet, ausgehend von der Berücksichtigung der genannten patienteneigenen Ausgangsfaktoren (Alter, Vorerkrankungen, Stoffwechselstörungen, Ernährungsgewohnheiten, etc.), fünf grundlegende und eng miteinander agierende Bausteine, die in Bezug auf die Frakturheilung von elementarer Bedeutung sind:

1. Vaskularität, 2. Mechanische Stabilität, 3. Osteogene Zellen, 4. Osteokonduktive Scaffolds und 5. Wachstumsfaktoren (Abbildung 6).

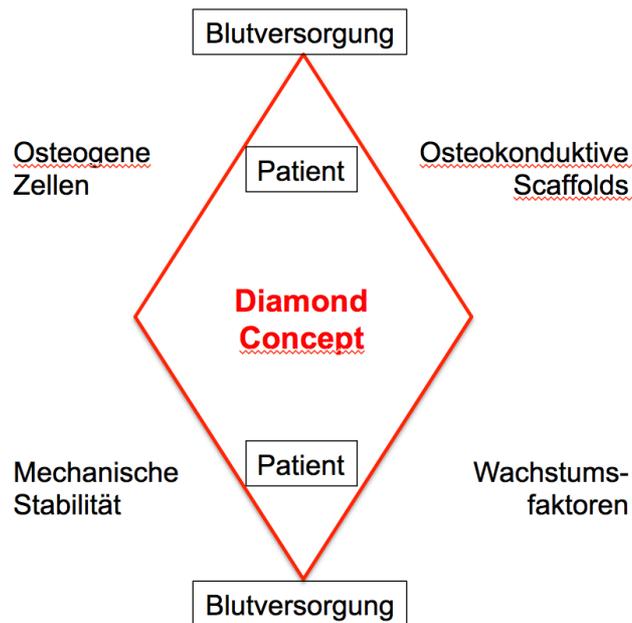


Abbildung 6: „Diamond Concept“ der Interaktion von assoziierten Faktoren der Frakturheilung. (Modifiziert nach Giannoudis et al. 2008 <sup>91</sup>)

In dem Verständnis dieser einzelnen Bestandteile und aufgrund des zunehmenden Wissenszuwachses über die komplexe intrinsische Sequenz von molekularen, mikrovaskulären und zellulären Abläufen bei der Frakturheilung haben sich im Rahmen von multimodalen Therapieansätzen vor allem die Wachstumsfaktoren, insbesondere die Bone Morphogenetic Proteins (BMP), als Mediatoren für die Beeinflussung der Frakturheilung herauskristallisiert <sup>92-102</sup>. Bei den BMPs handelt es sich um kleine Polypeptide, die in sehr geringer Konzentration in Zellen verschiedenster Gewebe gebildet werden und im Rahmen komplexer Regelmechanismen in ihre jeweilige Mikroumgebung sezerniert werden, um dort Regenerationsprozesse zu induzieren und koordinieren <sup>97</sup>.

## 1.6 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Im Jahr 1965 publizierte Dr. Marshall Raymond Urist das sogenannte „Knochen-Induktions-Prinzip“ <sup>103</sup>. Er und seine Kollegen konnten nachweisen, dass die Implantation von demineralisierter Knochenmatrix in ein extra-skeletales Gewebe eine Knochenneubildung induzieren kann. In der Folge identifizierten sie ein Protein,

welches für diese ektope Knochenbildung verantwortlich war und benannten es „Bone Morphogenetic Protein“ (BMP) <sup>103</sup>. Im Jahr 1988 entschlüsselten Wozney et al. die genetische Sequenz der BMPs <sup>104</sup>. Sie werden entsprechend ihres molekularen Aufbaus der TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )-Superfamilie zugeordnet und stellen in dieser Familie die größte Subgruppe dar. Es sind bis heute mehr als 20 verschiedene BMP Subtypen beschrieben <sup>101</sup>.

Die Signaltransduktion erfolgt über die extrazelluläre Bindung der BMPs an transmembranäre Typ I (BMPR-I) und Typ II (BMPR-II) Serin/Threonin Kinase Rezeptoren. Nach Bindung des Liganden an den Typ I Rezeptor aktivieren die Serin/Threonin Kinase Domänen der Typ II Rezeptoren die Kinasen der Typ I Rezeptoren und induzieren damit die intrazelluläre Signalkaskade. Intrazellulär führt die damit verbundene Aktivierung von Rezeptor-regulierten Smad Proteinen (small body size; mothers against decapentaplegic) zu einer Komplexbildung und nach Einschleusung in den Zellkern zur Transkription BMP-spezifischer Zielgene. Es besteht eine komplexe Regulation durch eine Vielzahl von extrazellulären (z.B. Noggin, Sklerostin), transmembranären (BAMBI), intrazellulären (Smurf 1/2, Smad-6, Smad-7) und intranukleären (Ski, SnoN) Agonisten/Antagonisten Systemen oder negativen Rückkoppelungsmechanismen (Abbildung 7) <sup>105-109</sup>.

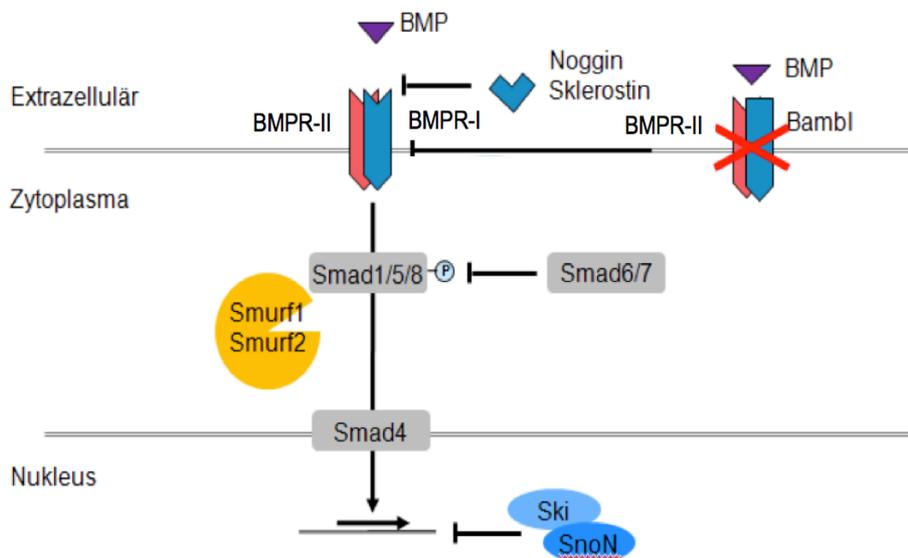


Abbildung 7: Signaltransduktion und Regulation von Bone Morphogenetic Proteins. (Modifiziert nach Bramlage et al. 2005 <sup>110</sup>)

BMPs sind maßgeblich an einer Vielzahl von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Sie spielen durch ihre Regulation von Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis, Adhäsion und Apoptose von Zellen eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und nahezu allen Organen und Geweben. Ferner regulieren sie die Homöostase der adulten Formen dieser Gewebe. Sie sind involviert bei verschiedensten Stoffwechsel- und Knochenerkrankungen und auch in der Tumorgenese <sup>110-113</sup>.

Im Bezug auf die Knochenheilung besteht die herausragende Rolle der BMPs in ihrem Einfluss auf endotheliale, mesenchymale und knochenspezifische Zellen mit der Konsequenz einer osteoinduktiven Wirkung. Sie stimulieren die Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten <sup>114, 115</sup>. Zusätzlich werden die Bildung von extrazellulären Matrixbestandteilen im Knorpel- und Knochengewebe unterstützt, sowie degenerative Mechanismen inhibiert <sup>106, 115, 116</sup>. Die BMPs mit der höchsten osteogenen Kapazität sind BMP-2, -4, -5, -6 und -7 <sup>106</sup>, wobei das BMP-2 und das BMP-7 bezüglich der ossären Applikationen am detailliertesten untersucht sind.

In einer Vielzahl von präklinischen Tierversuchen konnte die osteoinduktive Potenz von BMPs nachgewiesen werden. Im Rahmen von segmentalen Knochendefektmodellen führte die lokale Applikation mittels verschiedener Trägersubstanzen zu einer entsprechenden Knochenneubildung in den jeweiligen Defekten, und sie zeigte sich gleichwertig oder zum Teil überlegen zum Goldstandard, der Transplantation von autologer Spongiosa <sup>117-125</sup>. Ferner konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die lokale Applikation von BMPs auch die Frakturheilung beschleunigen kann <sup>95, 126-129</sup>.

## **1.7 Klinische Anwendung von BMPs**

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen aus den experimentellen und präklinischen Studien begannen zum Ende der 80er Jahre die ersten klinischen Anwendungen von BMPs für die Frakturheilung und die Behandlung von Pseudarthrosen. Die ersten Arbeiten im Bereich der Tibia erfolgten, damals noch mit humanem BMP (hBMP), durch Johnson et al. im Rahmen der segmentalen Defektrekonstruktion <sup>130</sup>, sowie für die Behandlung von tibialen und femoralen Pseudarthrosen <sup>131, 132</sup>.

Durch die kommerzielle Verfügbarkeit gentechnisch erzeugter, rekombinanter humaner BMPs (rhBMP) erfolgte der verbreitete klinische Einsatz im Bereich der Fraktur- und Defektheilung<sup>133, 134</sup>, sowie auch in der Wirbelsäulenchirurgie im Rahmen von Wirbelkörperfusionen<sup>135, 136</sup>. Die erste prospektiv randomisierte Studie betreffend der klinischen Anwendung von Friedlaender et al. aus dem Jahr 2001 verglich bei insgesamt 124 Patienten den Einsatz von rhBMP-7 (mit bovinem Rinderkollagen als Trägersubstanz) und dem Goldstandard, autologer Transplantation von Beckenkammpongiosa, bei therapieresistenten Pseudarthrosen der Tibia<sup>137</sup>. Im Ergebnis war das klinische und radiologische Resultat in beiden Gruppen vergleichbar gut, wobei in der Autograft Gruppe 20% der Patienten über chronische Schmerzen im Bereich der Autograft Entnahmestelle am Beckenkamm klagten. Dies wurde als Vorteil für die BMP Applikation gewertet. Eine weitere prospektiv randomisierte Studie aus dem Jahr 2002 untersuchte die Sicherheit und den Effekt der lokalen Applikation von rhBMP-2 (mit einem absorbierbaren Kollagenschwamm als Trägersubstanz) auf die Frakturheilung bei offenen Frakturen von 450 Patienten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne die Applikation von rhBMP-2 wurde eine signifikant geringere Rate an Infektionen und Revisionseingriffen aufgrund verzögerter oder ausbleibender Heilungen, sowie eine signifikant schnellere Fraktur- und Wundheilung beschrieben<sup>138</sup>. Diese Ergebnisse wurden durch eine später durchgeführte Subgruppenanalyse von Swiontkowski et al. gerade auch für höhergradig offene Frakturen (Gustilo/ Anderson Grad III), die eine gesteigerte Rate an Delayed und Non-unions zeigen, bestätigt<sup>139</sup>.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind diese zwei BMPs in Kombination mit ihrem kollagenen Trägersystem für die lokale Applikation an der Tibia zugelassen. Das rhBMP-2 (als Infuse® in den U.S.A. und InductOS® in Europa von Wyeth Pharma GmbH, Münster, Deutschland) ist für die Anwendung bei offenen Tibiaschaftfrakturen zugelassen. Das rhBMP-7 (auch genannt: Osteogenic Protein-1 (OP-1)) als Osigraft® (aktuell nicht mehr kommerziell verfügbar, zuletzt vertrieben von Olympus Biotech Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) ist als Alternative zur autologen Spongiosatransplantation bei therapierefraktären Tibiapseudarthrosen zugelassen<sup>100</sup>. Weitere Zulassungen bestehen bei beiden rhBMPs für spinale Applikation bei Wirbelkörperfusionen und für das rhBMP-2 zusätzlich für die Augmentation von Kieferhöhlendefekten in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie<sup>100</sup>.

Nach den klinischen Zulassungen hat der Einsatz von rekombinanten BMPs einen großen Zuwachs erfahren, wobei in bis zu 85% der Fälle die Applikation außerhalb der Zulassungen, im Sinne eines „off-label“ Einsatzes, durchgeführt wurde <sup>140</sup>. So erfolgte der Einsatz übergreifend bei Pseudarthrosen weiterer Lokalisationen, wie der Klavikula, dem Humerus, dem Unterarm, dem Femur <sup>141-145</sup>, bei der chirurgischen Therapie von persistierenden Instabilitäten des Beckens <sup>146</sup> oder bei Arthrodesen des Fußskelettes <sup>147</sup>.

## 1.8 Bisphosphonate

Ein weiterer Ansatz zur positiven Beeinflussung der Knochenheilung könnte der Einsatz von Substanzen sein, deren Therapieeffektivität bereits bei Knochenstoffwechselerkrankungen validiert wurde. Zu diesen Substanzen gehören die Bisphosphonate. Obwohl sie bereits im 19. Jahrhundert synthetisiert wurden, fand der Einzug in die Therapie von Störungen des Kalzium Metabolismus erst in den letzten 40 Jahren statt <sup>148</sup>. Genauere Erkenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen konnten erst in den letzten 15 Jahren erzielt werden <sup>149</sup>. Bisphosphonate sind synthetische Analoga des anorganischen Pyrophosphats, wobei im Gegensatz zum Pyrophosphat das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom (C) ersetzt ist. Zwei Phosphorgruppen (P) sind über stabile Phosphor-Ether-Bindungen an dieses zentrale Kohlenstoffatom (C) gebunden (Abbildung 8) <sup>150</sup>. Das resultierende P-C-P Rückgrat ermöglicht die Bindung zu divalenten Metallionen wie dem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und führt darüber in vivo zur Bindung von Bisphosphonaten an mineralische Oberflächen <sup>151</sup>, was die Grundlage für die selektive Aufnahme in den Knochen darstellt <sup>149</sup>. Die P-C-P Bindung kann weder chemisch noch enzymatisch gespalten werden und ist daher verantwortlich für die Degradationsresistenz der Bisphosphonate <sup>152</sup>. Das von den Osteoklasten induzierte saure Milieu in den Resorptionslakunen während der Knochenresorption führt zur Dissoziation der Bisphosphonate von der mineralischen Knochenoberfläche und zur Aufnahme in die Osteoklasten durch Endozytose <sup>153</sup>. Das zentrale Kohlenstoffatom bindet im Gegensatz zum Pyrophosphat zwei weitere Seitenketten, R1 und R2 (Abbildung 8). Generell führt die Substitution einer Hydroxylgruppe an R1 zu einer höheren Affinität zum Knochen <sup>154</sup>, während das Vorhandensein eines Stickstoffatoms (N) an R2 zu einer Erhöhung der antiresorptiven Aktivität führt <sup>152 155</sup>.

Das Zolendronat (ZOL), als Bisphosphonat der dritten Generation, enthält an R2 einen heterozyklischen Ring mit zwei Stickstoffatomen (Imidazolring) und zählt dadurch zu den potentesten Bisphosphonaten (Abbildung 8) <sup>156</sup>. Diese Konfiguration inhibiert die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthetase (FPPS), ein Enzym im Mevalonsäurestoffwechsel, über welchen die Biosynthese von Cholesterin und Lipiden läuft, die für die post-translationale Modifikation von Proteinen zuständig sind <sup>152, 155</sup>. Es wird vermutet, dass die Inhibition der FPPS über die Anhäufung von bestimmten Metaboliten zur Apoptose von Osteoklasten führen kann und ATP(Adenosin Triphosphat)-abhängige Kaskaden behindert werden, welche für die resorptive Funktion von Osteoklasten unabdingbar sind <sup>150, 157</sup>. In Zellkulturversuchen konnte weiterhin die Inhibition der Proliferation und der Rekrutierung von Osteoklasten nachgewiesen werden <sup>158-160</sup>. In Bezug auf Osteozyten und Osteoblasten wird für die Bisphosphonate hingegen eine protektive Wirkung beschrieben und es wird vermutet, dass zumindest ein Teil der antiresorptiven Wirkung auch über den positiven Einfluss auf die Osteoblasten vermittelt wird <sup>161, 162</sup>. Diese sezernieren Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand (RANKL) und seinen Inhibitor Osteoprotegerin (OPG) und modulieren über dieses System die Osteoklastendifferenzierung <sup>163</sup>. So wurde nach Applikation von Zolendronat eine verminderte Expression von RANKL und eine vermehrte Expression von OPG, sowie von Typ-I Kollagen durch humane Osteoblasten nachgewiesen <sup>158, 164, 165</sup>. Da die Quantität der physiologischen Knochenresorption unter anderem durch dieses System gesteuert wird, hat das Ungleichgewicht von RANKL (↓) und OPG (↑) einen hemmenden Effekt auf die Knochenresorption.

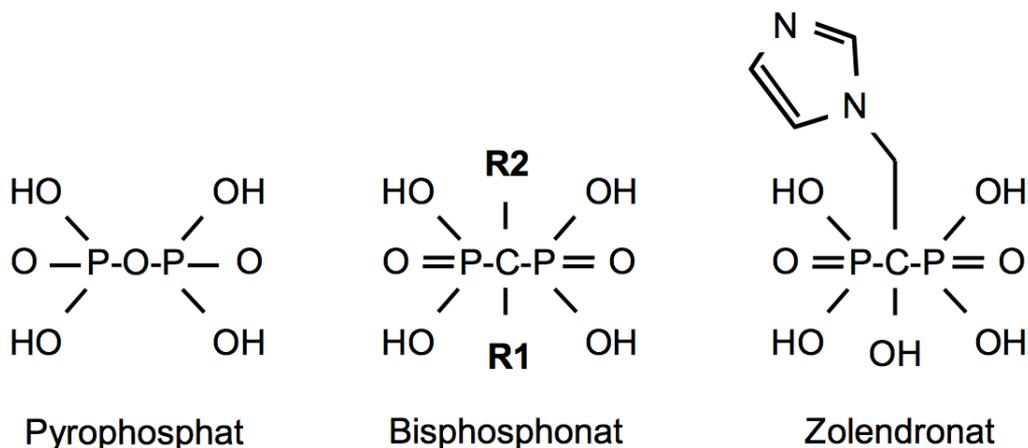


Abbildung 8: Strukturformeln von Pyrophosphat, Bisphosphonaten (allgemein) und Zolendronat

Zoledronat ist als systemisches Therapeutikum im breiten klinischen Einsatz bei verschiedensten gutartigen und bösartigen Skeletterkrankungen. Dazu gehören z.B. die tumorinduzierte Hyperkalzämie, das Multiple Myelom, Skelettmetastasen, der Morbus Paget und die postmenopausale Osteoporose<sup>156, 166, 167</sup>. Im Rahmen einer lokalen Applikation könnte sich zur Prävention von Heilungsstörungen bei akuten Frakturen oder bei der operativen Revision von manifesten Pseudarthrosen des Tibiaschaftes der positive Effekt auf den Knochenstoffwechsel als günstig erweisen und er bietet daher einen interessanten Ansatz für deren Prophylaxe und Therapie.

### **1.9 Lokale Applikationsmethoden**

Aufgrund der multifunktionalen Rolle der BMPs in der embryonalen Entwicklung und vor allem der andauernden Kontrolle multipler Regulationsmechanismen im gesamten Organismus scheint eine systemische Applikation für die therapeutische Stimulation der Knochenheilung nicht sinnvoll, sondern eher gefährlich. Daher ist die lokale Applikation anzustreben. Es konnte gezeigt werden, dass der lokale Abbau von rhBMPs schnell verläuft und die Aktivität einen dosisabhängigen und zeitlichen Bezug hat<sup>96</sup>. Um vor Ort die osteoinduktive Aktivität zu erreichen, sind der Aufbau einer lokalen Wirkkonzentration, sowie eine kontrollierte Freisetzung erforderlich. Daher zeigte sich, dass die Kombination mit einer Biomaterial-Matrix als Trägersubstanz („Drugcarrier“) erfolgen muss, um eine maximale Effektivität zu erzielen<sup>168</sup>. Da die systemische Anwendung von Bisphosphonaten ebenfalls das Risiko von Nebenwirkungen birgt, ist desgleichen eine lokale Applikation und Retention am Wirkort anzustreben.

Für die Therapie von Frakturen und Pseudarthrosen wäre eine Applikation von Wachstumsfaktoren (BMPs) oder Bisphosphonaten über eine biodegradierbare Beschichtung von etablierten Osteosynthesematerialien ideal, da hier das Implantat zum einen als mechanischer Stabilisator der Fraktur bzw. Pseudarthrose und zum anderen als „Drugcarrier“ für die lokale und kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder Bisphosphonaten dient<sup>95</sup>.

Das zunehmende Verständnis über das Zusammenspiel der Wachstumsfaktoren, deren komplexe Regulation und vor allem über die Nebenwirkungen nach Gabe supraphysiologischer Einzeldosen von BMPs haben die Suche nach optimalen Trägersubstanzen und Applikationsmethoden verfeinert. Es folgten Überlegungen

dahingehend, eine Bereitstellung von bioaktiven Substanzen auf physiologischerer Basis zu ermöglichen. In diesem Rahmen ist zumindest für die Bone Morphogenetic Proteins die Gentherapie in den Fokus der Wissenschaft gerückt <sup>169-173</sup>. Die therapeutische Strategie besteht hierbei in der indirekten Applikation des BMPs durch körpereigene Produktion nach Transfer von entsprechend kodierenden Gensequenzen in die Zielzellen. Der Gentransfer kann dabei auf zwei unterschiedlichen Arten erfolgen. Beim „in-vivo“ Gentransfer wird das genetische Material direkt in das entsprechende Gewebe transferiert, so dass die Zielzellen nach Aufnahme der spezifischen Gensequenz das entsprechende Protein vor Ort exprimieren <sup>169, 170, 173</sup>. Im Rahmen des „ex-vivo“ Gentransfers werden dem Organismus die Zielzellen zunächst entnommen, in vitro transfiziert und anschließend in das Zielgewebe reimplantiert, wo sie dann das entsprechend kodierte Protein exprimieren <sup>171, 172</sup>.

Der Transfer des genetischen Materials in die Zielzelle („in vivo“ oder „ex-vivo“ kann prinzipiell über zwei Arten von Genfähren (Vektoren) erfolgen.

1. Virale Genvektoren sind von natürlichen Viren abgeleitet. Ihrer Virulenz und ihrer Replikationsfähigkeit entzogen, stellen sie, durch ihre intrinsische Fähigkeit eine Wirtszelle mit genetischem Material zu infizieren, ein erfolgreiches Vehikel für den Transfer von externen Genen dar <sup>174</sup>. Generell basiert das Virusgenom auf DNA oder RNA, welche von einem Proteinkapsid eingehüllt ist. Eine Vielzahl von viralen Vektoren wurde untersucht. Zu den gebräuchlichsten zählen jedoch die retroviralen, adenoviralen, adenoviral-assoziierten Vektoren <sup>175</sup>. Der Vorteil der viralen Vektoren ist ihre hohe Effizienz. Nachteilig ist die Möglichkeit einer Immunreaktion auf die Viruspartikel, welche die transgene Expression verhindern kann und zu systemischen Reaktionen führen kann <sup>176, 177</sup>.

2. Nicht-virale Genvektoren stellen eine Gruppe von synthetisch konstruierten Genfähren dar. Sie haben eine einfachere Struktur als virale Vektoren und lassen sich in größerer Menge zu niedrigen Kosten produzieren. Das Aufnahmevermögen von Nukleinsäuren ist im Gegensatz zu den viralen Vektoren nicht durch ein Viruskapsid beschränkt. Diese Vektoren werden typischerweise mit Plasmid-DNA gekoppelt. Da sie keine wesentlichen, antigenen Materialien beinhalten, ist eine gesteigerte Immunantwort nicht zu erwarten und multiple Applikationen sind möglich. Der große Nachteil der nicht-viralen Genvektoren liegt in der reduzierten

Transfektionseffizienz im Vergleich zu den viralen Vektoren, während die Sicherheit dieser Vektoren wiederum einen großen Vorteil darstellt<sup>174, 178, 179</sup>.

## **2 Wissenschaftliche Fragestellungen**

Neben der Durchführung experimenteller Untersuchungen zu pathophysiologischen Grundlagen und zur therapeutischen Beeinflussbarkeit der ossären Regeneration bei Pseudarthrosen, stand im Rahmen einer klinischen Studie die detaillierte Analyse prognostisch-relevanter Outcomeparameter nach erfolgreicher Behandlung von Tibiaschaftpseudarthrosen im Vordergrund. Hierzu wurden Patienten über einen mittleren Zeitraum von fünf Jahren nachuntersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche klinischen Ergebnisse zeigen sich nach erfolgreicher, operativer Versorgung von Patienten mit Pseudarthrosen des Tibiaschaftes im Langzeitverlauf bezüglich der Funktion und der Lebensqualität?
2. Stellen sich bestimmte patientenspezifische und/oder verletzungsassoziierte Faktoren in der Korrelation als determinierend für die resultierende postoperative Lebensqualität heraus?

Zusätzlich zu diesen klinischen Untersuchungen und den identifizierten, pathogenetisch relevanten Faktoren sollten experimentelle Therapieansätze zur verbesserten Frakturheilung und für die Pseudarthrosenbehandlung entwickelt und hinsichtlich Ihrer Effektivität evaluiert werden.

Mit dem Ziel die Therapie von Tibiaschaftpseudarthrosen zu optimieren stand insbesondere die Frage nach einer positive Beeinflussung der Knochenheilung durch innovative Modulationen des Knochenstoffwechsels im Mittelpunkt der experimentellen in vitro und in vivo Untersuchungen. Zusätzlich war es das Ziel, durch die Kombination der Knochendefektfüllung mit einer lokalen Antibiotikagabe neue therapeutische Ansatzpunkte in der Prophylaxe und Therapie von atropen und

Infektpseudarthrosen in Hinsicht auf eine Verbesserung der Behandlungsergebnisse zu validieren.

Zur Überprüfung der genannten Ansätze sollten im Einzelnen dabei folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Erweist sich eine biodegradierbare Poly(D,L-laktid) Implantatbeschichtung zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren in vivo hinsichtlich ihrer Biokompatibilität als geeignet?
2. Welchen Effekt zeigt der non-virale Gentransfer von BMP-2 Plasmiden über die lokale Applikation in einer Poly(D,L-laktid) Implantatbeschichtung auf die Frakturheilung?
3. Welchen histologischen Aspekt zeigt humanes Pseudarthrosengewebe und wie ist dessen Zusammensetzung bezüglich relevanter Wachstumsfaktoren?
4. Welchen Einfluss hat die lokale Applikation von Bisphosphonaten über eine Poly(D,L-laktid) Implantatbeschichtung auf die Frakturheilung?
5. Kann Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) zur potentiellen Anwendung in der operativen Therapie von Pseudarthrosen als Knochenersatzmaterial in einfacher Weise und individualisiert mit verschiedenen Antibiotika kombiniert werden?

### **3 Klinische Ergebnisse nach Behandlung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes**

#### **3.1 Funktionelles Outcome und Lebensqualität im Langzeitverlauf nach erfolgreicher Therapie von tibialen Pseudarthrosen**

Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions.

Wichlas F, Tsitsilonis S, Disch AC, Haas NP, Hartmann C, Graef F, Schwabe P

Int Orthop. 2015 Mar;39(3):521-5.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00264-014-2629-y>

Frakturen des Tibiaschaftes zeigen in Abhängigkeit des stattgehabten Traumas, patientenspezifischer Faktoren, der Frakturcharakteristik und der anschließenden Versorgung eine Pseudarthrosenrate von 2,6 - 54%<sup>30, 31, 36, 38-40</sup>. Bisher sind eine Vielzahl von Behandlungsoptionen mit dem Ziel der erfolgreichen Knochen- und Weichteilheilung beschrieben worden. Im Rahmen gesamtkonzeptioneller Erwägungen und Bewertungen der einzelnen Therapieoptionen sind neben der Erhebung von funktionellen Parametern auch sozioökonomische Aspekte beleuchtet worden<sup>180</sup>. Die aus Patientensicht enorm relevante Lebensqualität nach Versorgung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes wurde bisher nur marginal, und wenn, dann nur für kurz- bis mittelfristige Zeiträume untersucht. Die Essenz aus diesen Daten zeigt bereits verheerende Einbußen der Lebensqualität an<sup>36, 181</sup>. Daher sollte aus Patientensicht in einer retrospektiven Analyse erstmalig im Langzeitverlauf, neben dem funktionellen Ergebnis, in erster Linie der Effekt auf die Lebensqualität nach erfolgreicher Behandlung von Pseudarthrosen untersucht werden.

Aus dem Zeitraum von 2002-2012 wurden von 76 Patienten mit Tibiaschaftpseudarthrose insgesamt 64 Patienten identifiziert, bei welchen die Pseudarthrose erfolgreich zur Ausheilung gebracht werden konnte. Der mittlere Nachuntersuchungszeitraum betrug 61,2±28,9 Monate. Die Bewertung hinsichtlich der Funktion erfolgte auf Grundlage von Bewegungsausmaßen, sowie dem AOFAS

(American Orthopaedic Foot and Ankle Society) Score. Die Bewertung der Lebensqualität wurde evaluiert mittels Short Form-36 (SF-36) Fragebogen und 10-Punkt Visueller Analogskala (VAS) für Schmerzintensität, Zufriedenheit mit der Gesamtbehandlung und des chirurgischen Outcomes und Einschränkungen der Aktivitäten des täglichen Lebens im Beruf und beim Sport.

Es konnte erstmalig dargestellt werden, welchen Einfluss Tibiaschaftpseudarthrosen auf die Funktion und vor allem die Lebensqualität von Patienten im Langzeitverlauf haben. Diese Ergebnisse sind insofern einmalig, als dass nur Patienten mit erfolgreichem Abschluss der Fraktur- und Weichteilbehandlung eingeschlossen wurden. Im Vergleich zur altersadaptierten Normalpopulation resultierten signifikante Einschnitte der Lebensqualität und Einschränkungen der Funktion, während zusätzlich die Subitems der einzelnen Scores signifikant miteinander korrelierten. Die Behandlungsdauer, vor allem aber die Schmerzintensität und die limitierte Dorsalextension im oberen Sprunggelenk stellten sich als wesentliche Faktoren für eine limitierte postoperative Lebensqualität heraus.

Während also bisher eine knöcherner Heilung und die Weichteilkonsolidierung die Parameter für eine erfolgreiche Behandlung darstellten, sollte die Bemessungsgrundlage auf die Aspekte der Lebensqualität erweitert werden. Zusätzlich ergibt sich aus der kombinierten Ansicht umso mehr die Notwendigkeit, Möglichkeiten zur Optimierung von Prävention und Therapie von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes zu entwickeln.

## **4 Experimentelle Konzepte zur Prophylaxe und Therapieoptimierung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes**

### **4.1 Untersuchung der Biokompatibilität einer biodegradierbaren Poly(D,L-laktid) Beschichtung für orthopädische Implantate**

Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)-growth factor coating for orthopaedic implants.

Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stöckle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G

Biomaterials. 2005 Jun;26(18):4035-40.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.004>

Ein Behandlungsansatz zur Prophylaxe und Therapie von Tibiaschaftpseudarthrosen stellt die lokale Applikation von bioaktiven Substanzen (z.B. Wachstumsfaktoren oder Bisphosphonaten) über eine Implantatbeschichtung als Trägersubstanz dar. Die Trägersubstanz zur Übermittlung dieser bioaktiven Substanz spielt dabei eine Schlüsselrolle.

Biodegradierbare Polymere aus der Familie der Polylaktidsäuren (PLA – polylactid acid) und Polyglykolsäuren (PLG – polyglycolic acid) sind bereits in der experimentellen und klinischen Anwendung verbreitet<sup>182-184</sup>. Poly(D,L-laktid) (PDLLA) ist ein Polylaktidsäure-Stereopolymer, welches im Organismus durch enzymatische Hydrolyse zu Monomeren abgebaut wird. Diese werden im Zitratzyklus in Wasser und Kohlensäure metabolisiert und in dieser Form ausgeschieden. Im Rahmen der Anwendung als Trägersubstanz und einer kontrollierten Freisetzung der bioaktiven Substanzen spielen die Polymerdegradierung und die Erosion (Massenverlust der Polymermatrix) eine entscheidende Rolle<sup>184, 185</sup>. Die Freisetzung der bioaktiven Substanz („drug-release“) erfolgt in zwei Schritten: erstens und hauptsächlich über Diffusion ohne Massenverlust und zweitens durch die Erosion der

Matrix<sup>184</sup>. Die Menge der bioaktiven Substanz kann, bezogen auf den Gesamtorganismus, durch die lokale Applikation gering gehalten werden. In Vorarbeiten wurden bereits die mechanische Stabilität, das Abbauverhalten des Trägermaterials PDLLA und die Freisetzungskinetik von inkorporierten bioaktiven Substanzen untersucht<sup>184</sup>. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Entzündungsreaktionen durch den Einsatz von größeren Mengen an Polylaktiden beschrieben wurden<sup>185</sup>, und diese gerade im Hinblick auf die Sicherheit und Effektivität einer weiteren Anwendung eine entscheidende Rolle spielen, sollte die Biokompatibilität der Implantatbeschichtung untersucht werden.

In einem etablierten Frakturmodell wurden Tibiae von Ratten mit PDLLA+Wachstumsfaktoren beschichteten versus unbeschichteten Kirschnerdrähten stabilisiert. Nach 5, 10, 15 und 28 Tagen erfolgte die histologische Aufarbeitung der Tibiae mit immunhistochemischer Darstellung und quantitativer Analyse von Makrophagen/Monozyten und Osteoklasten. In den Ergebnissen zeigte sich in den frühen Untersuchungszeitpunkten (5-15 Tage) eine Infiltration von Monozyten und Makrophagen entsprechend der akuten Entzündungsphase im Rahmen des regulären Frakturheilungsprozesses. Nach 28 Tagen konnte eine deutliche Regredienz der Monozyten und Makrophagen vor allem auch im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbeschichteten Implantaten festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützten vorangegangene Studien, bei denen im Rahmen desselben Modells nach 28, 42 und 84 Tagen weder deskriptiv-histologisch noch radiologisch Zeichen einer gesteigerten Entzündung gesehen werden konnten<sup>182, 186</sup>.

Zusammengefasst konnte also in vivo dargestellt werden, dass der Einsatz der Beschichtung keine gesteigerten Fremdkörper- oder Entzündungsreaktionen hervorruft. Daher wurde es als sicheres Trägermaterial für die klinische Behandlung von Pseudarthrosen angesehen.

## **4.2 Effekt eines neuen, nicht-viralen Gentransfers von BMP-2 auf die Knochenheilung**

Effect of a novel nonviral gene delivery of BMP-2 on bone healing.

Schwabe P, Greiner S, Ganzert R, Eberhart J, Dähn K, Stemberger A, Plank C, Schmidmaier G, Wildemann B

ScientificWorldJournal. 2012;2012:560142.

<http://dx.doi.org/10.1100/2012/560142>

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen zur bioaktiven Implantatbeschichtung sollte im weiteren der Effekt eines nicht-viralen Gentransfers von BMP-2 auf die Knochenheilung, vermittelt über die PDLLA-Beschichtung von Implantaten im Sinne eines genaktivierten Implantats, untersucht werden.

Der innovative Ansatz der Genthherapie stützt sich auf die Tatsache, dass die Daten aus den klinischen Anwendungsstudien der BMPs zwar vielversprechende Resultate zeigten, aber bezogen auf die stimulierenden Effekte in experimentellen und präklinischen Versuchsreihen, unter den erhofften Erwartungen blieben<sup>138, 187</sup>. Es wurde vermutet, dass eine exogene Einzelgabe von BMPs in supraphysiologischer Dosis kein adäquates osteoinduktives Signal erzeugen kann, vor allem in Situationen mit schlechter Knochensubstanz und unzureichender Blutversorgung, wie das insbesondere bei Pseudarthrosen der Fall sein kann. Die Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren im Gewebe ist sehr kurz, beim BMP-2 liegt sie zwischen 7-16 Minuten<sup>188 189</sup>. Daher bietet der genterapeutische Ansatz die Möglichkeit, über das Einbringen einer genetischen Sequenz, eine physiologischere endogene und länger andauernde BMP Expression zu erreichen.

Um diesen Ansatz für eine mögliche Therapiestrategie in der Behandlung von Tibiaschaftpseudarthrosen zu untersuchen, wurde der Einfluss eines genaktivierten Implantats auf die Knochenheilung in der Rattentibia untersucht. Im Rahmen eines nicht-viralen Gentransfers wurde für BMP-2 kodierende Plasmid-DNA über einen Copolymer-geschützten Genvektor (COPROG – Copolymer Protected Gene Vector), eingebettet in eine PDLLA-Beschichtung, auf Titan Kirschnerdrähten in frakturierte Tibiae eingebracht.

Die Ergebnisse zeigten nach 28 und 42 Tagen sowohl radiologisch, als auch histologisch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Knochenheilung, obgleich die transgene Expression von BMP-2 über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar war. In der biomechanischen Testung zeigte sich nach 42 Tagen jedoch eine signifikant höhere Versagenslast der Gentransfergruppe verglichen zur Kontrollgruppe, während für die torsionale Steifigkeit zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede gefunden werden konnten. Die Untersuchung verschiedenster Organsysteme ergab keine Biodistribution außerhalb vom Wirkungsbereich an der Tibia, sodass der Gentransfer mit dieser Methode als sicher einzustufen war.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass osteogene Zellen über Copolymer geschützte Genvektoren mit BMP-2 Plasmid-DNA erfolgreich in vivo transfiziert werden können und eine transgene Expression über einen Zeitraum von mindestens 42 Tagen aufrecht erhalten werden kann. Die weiteren Überlegungen zu den geringen Auswirkungen auf die Frakturheilung bezogen sich auf eine möglicherweise zu niedrig gewählten Plasmidkonzentration. Basierend auf der Erkenntnis, dass im Rahmen der Frakturheilung die Interaktion von Zellen durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert wird, stellte sich weiterhin die Frage, inwieweit die Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors für die positive Beeinflussung der Knochenheilung ausreichend ist. Zum weiteren Verständnis sollte daher die Analyse von humanem Pseudarthrosengewebe Aufschluss über die Komposition und Interaktion von Wachstumsfaktoren im Vergleich zu Gewebe nach regelhafter Frakturheilung geben.

#### **4.3 Darstellung der Histologie und Bestimmung von Wachstumsfaktorkonzentrationen in humanem Pseudarthrosengewebe**

A pilot study investigating the histology and growth factor content of human non-union tissue.

Schwabe P, Simon P, Kronbach Z, Schmidmaier G, Wildemann B

Int Orthop. 2014 Dec;38(12):2623-9.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00264-014-2496-6>

Während der frühen Phase der Frakturheilung und Knochenregeneration werden zahlreiche für therapeutische Ansätze relevante Wachstumsfaktoren sowohl sequentiell, als auch simultan exprimiert<sup>96, 190, 191</sup>. Im Hinblick auf die Fokussierung von Wachstumsfaktor-basierten Therapiestrategien für die Behandlung von Pseudarthrosen war es Ziel dieser Untersuchung die Zusammensetzung von verschiedenen Wachstumsfaktoren in humanem Gewebe, welches im Rahmen der operativen Pseudarthrosenrevision entnommen wurde, zu bestimmen. Als Kontrolle diente dabei Gewebe, welches bei Implantatentfernungen nach regelrecht geheilter Fraktur aus der Region der ehemaligen Fraktur entnommen wurde. Die Alters- und Geschlechtsdistribution der insgesamt 57 Patienten (44 Pseudarthrosen und 13 Kontrollen) war bis auf einen Überhang von männlichen Patienten in der Kontrollgruppe vergleichbar. Neben einer Quantifizierung von IGF-I, TGF- $\beta$ 1, BMP-2, -4, -7, PDGF-AB, VEGF-A und IL-6 im Gewebe, erfolgte zusätzlich die immunhistochemische Gefäßdarstellung über  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) und von den bekannten BMP Antagonisten Sklerostin und Noggin. Dies ist die erste Studie, welche in humanem Pseudarthrosengewebe die Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren auf Proteinbasis untersucht hat. Die deskriptive Histologie und die Immunhistologie zeigten keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Gefäße, bzw. Expression beider BMP Antagonisten innerhalb der unterschiedlichen Gruppen. Die Faktoren IL-6 und IGF-I konnten in einigen Proben nicht gemessen werden. Die Werte für BMP-2 lagen unterhalb der Nachweisgrenze in allen Proben beider Gruppen. Während die Menge von BMP-4, TGF- $\beta$ 1 und

VEGF-A in beiden Gruppen nicht unterschiedlich war, zeigte sich eine signifikant geringere Menge von BMP-7 und PDGF-AB.

Die unterschiedliche Menge der Wachstumsfaktoren und gleichzeitige Expression von BMP Gegenregulatoren in beiden Gruppen deutet darauf hin, dass die Effektivität in der Unterstützung der Knochenheilung auf Basis der Applikation von Wachstumsfaktoren nicht maßgeblich durch die Einzelgabe einer Substanz gesteigert werden kann. Vielmehr lässt sich hieraus ableiten, dass neue Behandlungsansätze das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren und deren Regulationsmechanismen berücksichtigen müssen.

#### **4.4 Einfluss der lokalen Applikation von Zolendronat in einer Poly(D,L-laktid) Implantatbeschichtung auf die Frakturheilung**

Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats.

Greiner S, Wildemann B, Back D, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G  
Acta Orthop. 2008 Oct;79(5):717-25.

<http://dx.doi.org/10.1080/17453670810016768>

Ein weiterer, von den Wachstumsfaktoren unabhängiger Ansatz zur Therapieoptimierung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes ist die lokale Applikation von Zolendronat (ZOL) inkorporiert in PDLLA (Poly(D,L-laktid)) als bioaktive Beschichtung für Implantate. In eigenen Vorarbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Art der Applikation von Zolendronat in vitro zu einem signifikanten Abfall der Osteoklastenbildung und -aktivität führt und die osteogene Differenzierung positiv beeinflusst wird<sup>158, 192</sup>. Es sollte im folgenden Ansatz überprüft werden, inwiefern sich die lokale Applikation in dieser Form in vivo auf die Knochenheilung auswirkt.

Hierfür wurden im Rahmen des etablierten Frakturmodells der Rattentibia unbeschichtete versus PDLLA-beschichtete versus ZOL+PDLLA beschichtete Titan Kirschnerdrähte als intramedulläre Kraftträger in die Tibia nach standardisierter Schafffraktur eingebracht. Nach 42 und 84 Tagen erfolgten jeweils die Entnahmen der Tibiae und die biomechanischen Testungen. Die radiologische Verlaufsbeurteilung zu den entsprechenden Zeitpunkten zeigte nach 42 Tagen eine signifikant bessere Überbrückung für die ZOL-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Beschichtung. Weiterhin zeigte sich eine signifikant vermehrte Kallusbildung der ZOL-Gruppe im Vergleich zur PDLLA-Gruppe und zur unbeschichteten Gruppe nach 42 und 84 Tagen. In der biomechanischen Testung war nach 42 Tagen sowohl bezüglich der torsionalen Steifigkeit, als auch des maximalen Drehmoments die ZOL-Gruppe den beiden anderen Gruppen signifikant überlegen. Nach 84 Tagen zeigten sich bezüglich der torsionalen Steifigkeit noch signifikant bessere Werte in der ZOL-Gruppe im Vergleich zur unbeschichteten

Gruppe, während sich die Werte des maximalen Drehmoments nicht mehr signifikant unterschieden.

Durch den positiven Einfluss des Konzeptes auf die Knochenheilung in vivo konnte die Relevanz dieses Ansatzes für die Stimulation der Knochenheilung in der Pseudarthrosentherapie dargestellt werden.

#### **4.5 Analyse der Freisetzungskinetiken von verschiedenen Antibiotika nach Kombination mit Knochenersatzmaterial (Demineralisierter Knochenmatrix)**

Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure.

Bormann N, Schwabe P, Smith MD, Wildemann B

Bone. 2014 Feb;59:162-72.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.11.005>

Im Rahmen der Behandlung von Infektpseudarthrosen entstehen nach dem Debridement des infizierten Bindegewebes oder der Entfernung von Knochensequestern aus der ehemaligen Frakturregion oftmals ausgedehnte knöcherne Defekte. Diese müssen sekundär mit Knochenmaterial oder Knochenersatzmaterial gefüllt und rekonstruiert werden, um eine knöcherne Überbrückung zu ermöglichen. Aktuell stellt die Transplantation von autologem Knochenmaterial hierfür den Goldstandard dar <sup>193, 194</sup>. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Defektauffüllung könnte gerade für infizierte Pseudarthrosen eine lokale Antibiotikatherapie über die Kombination mit dem Knochenersatzmaterial zum Schutz des Knochenregenerats sein. Dabei scheint gerade die Möglichkeit vielversprechend, das jeweilig gewünschte Antibiotikum im Rahmen eines einfachen Verfahrens perioperativ mit einem etablierten Knochenersatzmaterial, zum Beispiel Demineralisierter Knochenmatrix (DBM), zu vermischen. Dadurch kann im Rahmen des Sekundäreingriffes, additiv zur systemischen Antibiotikatherapie, ein zielgerichteter Schutz gegen die jeweiligen pathogenen Keime am Wirkort erreicht werden.

Neben der Untersuchung der Tauglichkeit und der intraoperativen Handhabbarkeit des Mischsystems für den perioperativen Einsatz sollte analysiert werden, welchen Einfluss verschiedene Antibiotikakonzentrationen und artifizielle Veränderungen des umgebenden Milieus auf die Freisetzungskinetik der Antibiotika aus der DBM in vitro haben. Als Wirkstoffe wurden Gentamicin, Tobramycin und Vancomycin eingesetzt. Zusätzlich zur pharmakologischen Aktivität wurde in der Zellkultur die mögliche

Toxizität der freigesetzten Substanzen über eine Vitalitäts- und osteogene Aktivitätsbeurteilung von primären osteoblasten-ähnlichen Zellen beurteilt. Im Ergebnis erwies sich das Mischsystem als einfach, sicher und gut reproduzierbar für den perioperativen Einsatz. Die Freisetzung von Gentamicin und Tobramycin fand unabhängig von unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen und verschiedener Umgebungsmilieus innerhalb von drei Tagen statt, während Vancomycin zumindest in einem Ansatz eine Freisetzungsdauer von 14 Tagen hatte. Die Effektivität der freigesetzten Antibiotika konnte über ein gehemmtes Wachstum von *Staphylococcus aureus* in allen Versuchsgruppen belegt werden. In der Zellkultur zeigte sich unabhängig von den Wirkstoffkonzentrationen keine signifikante Einschränkung der Vitalität und der osteogenen Aktivität der Zellen als Nachweis für die Sicherheit des Verfahrens.

Aus den Ergebnissen ergibt sich ein optimierter therapeutischer und präventiver Einsatzbereich dieser Methode sowohl im Rahmen der sekundären Defektauffüllung bei infizierten Pseudarthrosen, als auch im präventiven Ansatz bei der primären Defektrekonstruktion mit Knochenmaterial, wie sie beispielsweise bei atrophen Pseudarthrosen durchgeführt wird.

## **5 Diskussion**

Grundsätzlich gibt es effektive Ansätze zur Behandlung von tibialen Pseudarthrosen. Die meisten der hierzu verfügbaren klinischen Studien berichten über verschiedene chirurgische Techniken, unterschiedliche Implantatanwendungen und radiologische Konsolidierungsergebnisse ohne eine detaillierte Analyse der für die resultierende Funktion und postoperative Lebensqualität prognostisch relevanten Faktoren. Ferner ist die experimentelle Datenlage hinsichtlich der Entwicklung und Evaluation neuartiger Therapieansätze durch nur wenige, dezidiert auf die Stimulation der im Rahmen von Pseudarthrosen gestörten Knochenheilung ausgerichtete Arbeiten gekennzeichnet.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die klinischen Ergebnisse bisheriger Therapieverfahren mit Identifikation prognostisch relevanter Faktoren für die postoperative Lebensqualität und Extremitätenfunktion zu analysieren. Zusätzlich sollte anhand etablierter experimenteller Modelle zur Frakturheilung und mittels in vitro und in vivo Untersuchungen innovative Ansätze zur Prophylaxe und Therapieoptimierung von Pseudarthrosen Strategien entwickelt, validiert und hinsichtlich ihrer Effektivität analysiert werden.

### **5.1 Klinische Untersuchungen**

Unabhängig von der genauen Lokalisation bedeutet das Management einer tibialen Pseudarthrose für den behandelnden Chirurgen und den Patienten eine gleichsam aufwendige und anspruchsvolle Aufgabe. Entsprechende Therapiemaßnahmen beinhalten eine signifikant höhere Anzahl an chirurgischen Eingriffen und stationären Krankenhaustagen<sup>181</sup>. Während sich die meisten Studien zunächst auf funktionelle Gesichtspunkte fokussierten, gibt es bisher nur eine sehr übersichtliche Anzahl an Arbeiten, die sich mit der Thematik der Lebensqualität auseinandergesetzt haben. Die Ergebnisse daraus sind mehr als eindeutig, denn aus Patientensicht führt eine Pseudarthrose zu einer höchst relevanten Einschränkung der Lebensqualität. In einer aktuellen Studie von Brinker et al. wurden 237 Patienten mit insgesamt 243 Pseudarthrosen im Bereich des Tibiaschaftes hinsichtlich ihres funktionellen Ergebnisses und vor allem bezüglich ihrer Lebensqualität untersucht<sup>36</sup>. Die

Patienten hatten sich bis zu 23 Revisionseingriffen unterzogen. Mehr als die Hälfte der Patienten wurde mindestens zweifach revidiert. Der für die Lebensqualität erhobene Short Form-12 Physical Component Score (SF-12 PCS) lag mit seinem Punktwert unterhalb der 10. Perzentile der vergleichbaren Normalbevölkerung, während der Short Form-12 Mental Component Score (SF-12 MCS) gerade an die 25. Perzentile der Normalbevölkerung heranreichte. Damit besteht für Patienten mit einer Pseudarthrose des Tibiaschaftes eine Lebensqualität, die sowohl deutlich unterhalb des Levels einer Vielzahl an orthopädisch-unfallchirurgischen Erkrankungen, aber auch von weitverbreiteten, internistischen metabolischen oder Herz-/ Kreislaufkrankungen wie Asthma, Diabetes mellitus (Typ II), Bluthochdruck oder der koronaren Herzkrankheit angesiedelt ist. Auch der direkte Vergleich zwischen Patienten mit Pseudarthrosen (n=30) und geheilten Frakturen (n=30) des Tibiaschaftes zeigte, ermittelt über den SF-12 PCS und SF-12 MCS, ein signifikant schlechteres Ergebnis für die Patienten mit Pseudarthrose im punkto Lebensqualität<sup>181</sup>. Auch die Notwendigkeit für orthopädische Hilfsmittel war signifikant erhöht in der Pseudarthrosengruppe<sup>181</sup>. Während sich die genannten Studien nur auf mittelfristige Zeiträume beziehen, konnte unsererseits für Patienten mit Tibiaschaftpseudarthrosen dargestellt werden, dass die Auswirkungen auf die Lebensqualität und Funktion, evaluiert mit dem SF-36 Fragebogen, VAS Skalen (Schmerz, Patientenzufriedenheit und Einschränkungen im täglichen Leben) und dem AOFAS Score auch im langfristigen Verlauf (mittleres follow-up 61,2±28,9 Monate) verheerend sind. Die Werte aus allen Subgruppen des SF-36 zeigten sich signifikant vermindert zu den Werten der altersadaptierten, deutschen Normalpopulation. Der gleiche Effekt konnte ebenfalls von Bowen et al. gezeigt werden, allerdings für die kanadische Normalpopulation und im Rahmen einer nur kleinen Fallserie von neun Patienten mit tibialer Infektpseudarthrose<sup>195</sup>. Im Vergleich zu den von uns erhobenen Werten für den AOFAS Score konnten Shahid et al. bessere Werte darstellen<sup>196</sup>. Allerdings waren in dieser Studie sowohl die Gesamtanzahl der Operationen und die Dauer des Krankenhausaufenthaltes geringer, sowie der Nachuntersuchungszeitraum mit etwas über einem Jahr deutlich kürzer.

Aus sozioökonomischer Sicht sind zusätzlich die gesteigerten Kosten zu betrachten, welche die Behandlung von Patienten mit einer Pseudarthrose nach sich zieht. Ein direkter Kostenvergleich gestaltet sich schwer, da letztlich keine Pseudarthrose in Lokalisation, Ausprägung und Genese der anderen gleicht und die Therapien in der

Regel individualisiert sind. Allen gemeinsam sind jedoch die gesteigerten Kosten, welche die logische Konsequenz aus den zusätzlichen Eingriffen und aufwendigeren Nachbehandlungen darstellen. Es ist zu differenzieren zwischen direkten Kosten, welche durch die klinische und rehabilitative Versorgung entstehen und den indirekten Kosten, welche zum Beispiel durch die verlängerte oder komplette Arbeitsunfähigkeit, bzw. durch notwendige Wiedereingliederungsmaßnahmen entstehen können. Busse et al. konnten zeigen, dass sich die direkten und indirekten Kosten für die Behandlung von geschlossenen, bzw. erstgradig offenen Tibiafrakturen unabhängig von der Art der Therapie (Gips mit und ohne Ultraschallbehandlung, intramedulläre Marknagelung mit und ohne Aufbohren der Markhöhle) durch die Entwicklung einer verzögerten Heilung oder einer Pseudarthrose in etwa verdoppeln <sup>180</sup>. Für ein „best case scenario“ der Behandlung einer tibialen Pseudarthrose (Therapieansprechen nach einer Standardbehandlung) berechneten Kanakaris et al. direkte und indirekte Kosten von ca. 16.000£ <sup>197</sup>. Für Pseudarthrosen nach komplexeren Tibiaschaftfrakturen geht die finanzielle Schere im Rahmen der Behandlung weiter auf. Heckmann et al. verglichen nur die direkten Kosten nach Behandlung von Pseudarthrosen nach höhergradig offenen Tibiafrakturen (Gustilo/ Anderson Grad III) <sup>1</sup>. Diese beliefen sich für die sekundäre Amputation bei ca. 30.000 US\$ und für die Behandlung mit Ilizarov Fixateursystem bei ca. 60.000 US\$. Nach Einschluss der Kosten für die exoprothetische Versorgung stiegen die Kosten für die Gruppe der amputierten Patienten hingegen auf über 400.000 US\$.

Von allen Röhrenknochen zeigt die Tibia die höchste Rate an Pseudarthrosen. Die damit verbundenen psychosozialen Einschränkungen, chronischen Schmerzen und Funktionslimitierungen erfordern ein diffiziles und übergreifendes Management. Die Therapie ist ein langwieriger Prozess und erfordert zumeist multiple chirurgische Eingriffe, ist bei Infektpseudarthrose durch die notwendige Infektsanierung zusätzlich erschwert und hat eine enorme sozioökonomische Relevanz. Innovative Ansätze zur Prophylaxe und Therapie könnten dabei helfen, die Behandlung zu optimieren, das funktionelle Ergebnis sowie die postoperative Lebensqualität für den Patienten zu verbessern und letztlich die finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem zu minimieren.

## 5.2 Lokale Applikation von BMPs

Eine Vielzahl von Studien hat zum heutigen Verständnis der molekularen Grundlagen der Frakturheilung beigetragen. Basierend darauf hat sich die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren, insbesondere von BMPs als sinnvoll erwiesen, um die Knochenheilung positiv zu beeinflussen. BMPs sind löslich und sie werden schnell durch enzymatische Spaltung abgebaut<sup>189</sup>. Im Tierversuch sind beispielsweise für das BMP-2 Halbwertszeiten von 7-16 Minuten beschrieben<sup>189, 188</sup>. Präklinische Studien belegten, dass eine kontrollierte Freisetzung über einen längeren Zeitraum effizienter ist, als eine Bolusgabe und dadurch zusätzlich das Risiko von Nebenwirkungen reduziert werden kann<sup>98</sup>. Die Herausforderung liegt nun darin einen Träger zu finden, welcher den bioaktiven Wirkstoff zum Applikationsort transportiert und dort retiniert, damit er auch über einen längeren Zeitraum seine spezifischen Wirkungen entfalten kann. Die Anforderungen an einen optimalen Träger sind dabei vielfältig. Er sollte eine ausreichende mechanische Stabilität besitzen, biodegradierbar sowie sterilisierbar sein, eine flexible Dosierung der Wirkstoffe sowie eine reproduzierbare Freisetzungskinetik ermöglichen. Die Degradation sollte in einem Zeitrahmen erfolgen, in welchem die angestrebte Knochenformation nicht durch Residuen des Trägermaterials gestört wird. Weitere wichtige Parameter sind die einfache Handhabung durch den Anwender und die Biokompatibilität des Materials, um den Effekt eines assoziierten Entzündungsgeschehens auf die Knochenheilung zu minimieren<sup>168, 190</sup>. Aus diesem Ansatz heraus sind eine Vielzahl unterschiedlicher Carriersysteme entwickelt und untersucht worden<sup>96, 188, 198</sup>. Die klinisch zugelassenen BMPs werden mit bovinem Typ I Kollagen als Trägersubstanz appliziert, rhBMP-2 in Kombination mit einem Kollagenschwamm und rhBMP-7 mit Kollagenpartikeln. Typ I Kollagen bildet den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, ist dadurch biokompatibel und bioresorbierbar. Weiterhin bildet Kollagen eine osteokonduktive Matrix zur Aufnahme von neu gebildetem Knochen durch die Bindung von nicht-kollagenen Matrixproteinen, welche die Mineralisierung initiieren<sup>96, 199</sup>. Das Problem mit der klinischen Applikation der kollagenen Trägersubstanz ist die resultierende Immunogenität. Friedlaender et al. konnten in ihrer Studie mit 124 Patienten zum Einsatz von rhBMP-7 (in Kombination mit 1g bovinem Typ 1 Kollagen) bei tibialen Pseudarthrosen eine Antikörperbildung gegen das Kollagen in 5% der Patienten nachweisen<sup>137</sup>. In einer weiteren Studie konnte nach Applikation von rhBMP-2 mit

einem absorbierbaren Kollagenschwamm bei Tibiaschaftfrakturen eine Antikörperbildung in 17% der Patienten gegen das bovine Typ I Kollagen detektiert werden. Interessanterweise stieg die Anzahl der Patienten mit Antikörpern mit höherer Dosierung des rhBMP-2<sup>138</sup>. Ungewiss bleibt, welche Reaktionen sich bei den Patienten nach Applikation höherer Mengen BMP oder Kollagen und vor allem auch bei Zweitgabe nach primärer Sensibilisierung zeigen. Weiterhin wurde als bedenklich eingestuft, dass die Kombination von Kollagen mit rhBMPs in verschiedensten Tiermodellen erfolgreich verlief, während in der humanen Anwendung nur sehr hohe Dosen einen osteoinduktiven Effekt zeigen konnten<sup>99</sup>. Es wurde diskutiert, ob das Kollagen gegebenenfalls die Freisetzung von BMPs im Gewebe behindert und dadurch nur hohe Dosen wirksam sind<sup>99</sup>. Eine geeignetere Form der Applikation stellt die Einarbeitung von Wachstumsfaktoren (oder ähnlichen bioaktiven Substanzen, wie zum Beispiel von Bisphosphonaten) in eine Implantatbeschichtung aus Poly-(D,L-laktid) (PDLLA) dar. Hierbei fungiert das Implantat zum einen als mechanischer Stabilisator für den Knochen und zum anderen als Träger für bioaktive Substanzen bei kontrollierter Freisetzung aus der Beschichtung heraus. Natürlich muss die Beschichtung die Anforderungen einer geeigneten Trägersubstanz erfüllen. PDLLA ist biodegradierbar, seine Metabolite werden vollständig im Zitratzyklus abgebaut<sup>200</sup>. Die Degradation verläuft langsam. Es werden über einen Zeitraum von 6 Wochen *in vitro* und *in vivo* 7-8% der Beschichtung abgebaut<sup>184</sup>. Das ist vorteilhaft, denn ein zu schneller Abbau der Beschichtung könnte zu unkontrollierten Freisetzungen der bioaktiven Substanzen führen. Die Vorarbeiten hierzu zeigten eine kontrollierte Freisetzung der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren aus der Beschichtung zu ca. 50% innerhalb der ersten 48h mit einer weiteren Freisetzung von ca. 30% innerhalb der folgenden 42 Tage<sup>184</sup>. Im Vergleich dazu führt Applikation über einen Kollagenschwamm zu einer initialen Freisetzung der BMPs von 30%, gefolgt von einer weiteren kontinuierlichen Freisetzung mit einer Halbwertszeit von nur drei bis fünf Tagen<sup>201, 202</sup>. Die Beschichtung muss zusätzlich der mechanischen Belastung standhalten, die durch das Einbringen des Implantates erzeugt wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Abrieb nach Explantation eines PDLLA-beschichteten, intramedullären Marknagels gleichmäßig über das Implantat hinweg unter 3% betrug<sup>184</sup>. Die Praktikabilität für den klinischen Bereich zeigt sich auch durch die biologische Stabilität der Beschichtung. Darin eingearbeitete Wachstumsfaktoren verloren auch nach

Lagerung von 5 und 14 Monaten bei  $-20^{\circ}$  nicht ihre biologische Aktivität<sup>203</sup>. Hierauf aufbauend wurde die Biokompatibilität der bioaktiven Beschichtung im Tierversuch untersucht. Nach standardisierter Fraktur erfolgte die Implantation von PDLLA+Wachstumsfaktoren versus unbeschichteten Kirschnerdrähten in die Tibia von Ratten. Die Tibiae wurden nach 5, 10, 15 und 28 Tagen histologisch aufgearbeitet und hinsichtlich vorliegender Fremdkörperreaktionen evaluiert. Das Ergebnis zeigte eine Infiltration von Monozyten/Makrophagen zu den frühen Zeitpunkten nach 5-15 Tagen entsprechend der physiologischen Entzündungsreaktion nach Fraktur. Nach 28 Tagen konnte ein deutlicher Abnahme der zellulären Antwort, auch im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Damit stützten sich die Ergebnisse auf die *in vitro* Daten<sup>204</sup> und auf weitere *in vivo* Studien, bei denen in ähnlicher Konstellation nach 28, 42 und 84 Tagen weder histologisch, noch radiologisch gesteigerte Entzündungszeichen gesehen werden konnten<sup>182, 186</sup>. Zusammengefasst erfüllt die PDLLA Implantatbeschichtung zur kontrollierten Freisetzung von bioaktiven Substanzen die Bedingungen einer optimalen Trägersubstanz und scheint im Hinblick auf die klinische Applikation den aktuellen kollagenen Trägern überlegen. Im Tiermodell konnte eine beschleunigte Frakturheilung nach Einarbeitung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 oder rhBMP-2 nachgewiesen werden<sup>95, 182</sup>. Die PDLLA-Beschichtung weist ein sicheres Anwendungsprofil auf und der Einsatz in Kombination mit bioaktiven Substanzen scheint für die Prophylaxe und Therapie von Tibiaschaftpseudarthrosen vielversprechend.

### **5.3 Gentherapie**

Selbst unter der Vorstellung einer optimalen Trägersubstanz wird rhBMP aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und seines dosisabhängigen Effektes in Konzentrationen appliziert, welche die normale Konzentration im Knochen deutlich übersteigen<sup>178</sup>. Beispielsweise kann aus einem Kilogramm menschlichen Knochens ca. 1 $\mu$ g BMP extrahiert werden. Eine kommerzielle Dosis rhBMP-7 enthält 3,5mg. Dies ist äquivalent zu dem gesamten BMP-7 zweier menschlicher Skelette<sup>93</sup>. Hieraus erwachsen Befürchtungen bezüglich der Sicherheit und letztlich auch den Kosten, die eine klinische Therapie mit sich bringt. Diese Bedenken haben die Gentherapie in den Fokus wissenschaftlicher Überlegungen gebracht. Die grundlegende Idee dieses

Ansatzes ist es, über die Applikation des genetischen Materials für ein spezifisches Protein ein höheres und konstanteres Wirklevel zu induzieren, als es durch die exogene Applikation des Proteins erreicht werden kann. Entsprechend wurde im Hinblick auf den Einsatz in der Prävention und Behandlung von Pseudarthrosen ein Gentransfer von 40µg BMP-2 Plasmid-DNA über einen nicht-viralen Copolymer geschützten Genvektor in Kombination mit der PDLLA Implantatbeschichtung in der Zellkultur und in vivo an einem etablierten Rattenfrakturmodell durchgeführt. In der Zellkultur konnte eine Transfektion von primären Rattenosteoblasten und hierüber eine stabile BMP Expression bis zum 10. Tag gezeigt werden. In vivo konnte ein positiver Einfluss auf die Knochenheilung nur in der biomechanischen Auswertung nach 42 Tagen nachgewiesen werden. Ein Erklärungsansatz ist die Tatsache, dass nicht-virale Genvektoren eine generell niedrige Transfektionseffizienz aufweisen als virale Vektorsysteme. Es wird geschätzt, dass die Aufnahme von nicht-viralen Vektoren in die Zellen ca.  $10^9$ -fach geringer ist <sup>205</sup>. Andererseits besteht bei der Anwendung von viralen Vektorsystemen aufgrund der deutlich höheren Effizienz die Gefahr einer systemischen Distribution und einer immunogenen Antwort. Nach Injektion eines adenoviralen Vektors ( $10^8$  Viruspartikel) in den Beckenkamm von Schafen konnte beispielsweise eine Transduktion im Knochen, den benachbarten Muskeln und in den umgebenden Weichteilen über einen Zeitraum von fünf Wochen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich eine Genexpression in der Niere und der Schilddrüse <sup>169</sup>. Auch in einer weiteren Studie konnte selbst nach Applikation einer 10-fach geringeren Menge eines adenoviralen Vektors ( $10^7$  Viruspartikel) in einen femoralen Segmentdefekt von Kaninchen eine systemische Distribution bis in die Leber nachgewiesen werden <sup>206</sup>. Die Immunantwort auf virale Vektoren stellt hingegen die weitaus kritischere Komponente dar. Die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus greifen auf zellulärer Ebene durch Bereitstellung von zytotoxischen T-Zellen und auf humoraler Ebene durch die Synthese von Antikörpern gegen die viralen Proteine. Die zelluläre Immunantwort eliminiert die über den Vektor transduzierten Zellen. Die humorale Immunantwort verhindert eine repetitive Gabe des Vektors, da über das immunologische Gedächtnis die Antikörperbildung reaktiviert wird <sup>175</sup>. Über die viralen Partikel hinaus können auch die transgenen Proteine vom Wirtsorganismus als Fremdkörper erkannt werden und sowohl eine zelluläre, als auch humorale Immunantwort induzieren <sup>207</sup>. Die Immunogenität der adenoviralen Partikel zeigte sich in einer Studie nach Injektion in den

Osteotomiespalt von Pferdemetatarsalia. Es fanden sich anti-virale Antikörper im Serum über den gesamten Versuchszeitraum von 6 Wochen <sup>208</sup>. Bei der humanen Anwendung zur Therapie einer fatalen Stoffwechselkrankheit hat die Applikation eines Gens über einen adenoviralen Vektor innerhalb von 96 Stunden zum tragischen Tod des Patienten geführt <sup>209</sup>. Unter dem Aspekt, dass es sich bei tibialen Pseudarthrosen zwar um einen beeinträchtigenden Gesundheitszustand handelt, aber dieser in keinster Weise fatal ist, muss der Sicherheitsaspekt einer Gentherapie für muskuloskeletale Erkrankungen in den absoluten Vordergrund gestellt werden und die Anwendung viraler Vektoren kritisch betrachtet werden. Die Therapie mit dem nicht-viralen Copolymer-geschützten Vektor hat in der begleitenden Sicherheitsstudie keine Biodistribution außerhalb der Tibia ergeben. In der rt-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) Analyse zeigte sich keine Transfektion im ipsilateralen M. tibialis anterior und in entfernten Organen (Gehirn, Lunge, Leber, Nieren, Ovarien). Innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes wurden weder systemische Nebenwirkungen, noch relevante Änderungen der Blutparameter detektiert. Insgesamt konnte damit ein positives Sicherheitsprofil des Copolymer-geschützten Vektors dargestellt werden. Trotz der Diskussion um die niedrigere Transfektionseffizienz nicht-viraler Genvektoren konnte über den Ansatz mit dem Copolymer-geschützten Vektor mittels semiquantitativer PCR eine transgene Expression von BMP-2 über einen Zeitraum von 42 Tagen nachgewiesen werden. Dadurch bleibt die Frage offen, ob der nur geringgradige Effekt auf die Knochenheilung durch die geringe Menge an Plasmid-DNA (40µg) bedingt gewesen sein könnte. Fang et al. nutzten in ihrer Studie beispielsweise Plasmid-DNA Mengen von 0,5–1mg um einen segmentalen Tibiadeфекt in der Ratte zu überbrücken <sup>210</sup>. Verglichen dazu applizierten Bonadio et al. zur Überbrückung von tibialen und femoralen Segmentdefekten beim Hund sogar Plasmid DNA Mengen von 10–100mg <sup>211</sup>.

Weiterhin gibt die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den in vitro Daten und den in vivo Ergebnissen Anlass zur Überlegung, inwiefern sich klinisch die Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors in den Gesamtkreislauf der engen Regulation und des orchestrierten Zusammenspiels verschiedenster Faktoren einbinden kann, um schließlich positiv beeinflussend auf den Knochenstoffwechsel zu wirken. Zu diskutieren ist weiterhin, welche Faktoren tatsächlich in der Pseudarthrosensituation hoch- oder herunterreguliert sind. Um eine

Bewertungsgrundlage dafür zu erhalten, wurde das Gewebe von 44 humanen atrophen Pseudarthrosen und von 13 normal geheilten Frakturen histologisch aufgearbeitet und die Menge an relevanten Wachstumsfaktoren ermittelt. Die Faktoren BMP-7 und PDGF-AB waren im Vergleich zum Kontrollgewebe in den Pseudarthrosen signifikant reduziert. Interessanterweise war BMP-2 unterhalb der Nachweisgrenze in allen Proben. Brownlow et al. konnten in einem Pseudarthrosenmodell in der Ratte einen ähnlichen Effekt für das BMP-2 und auch das BMP-4 zeigen <sup>212</sup>, während BMP-4 in unserer Studie ohne signifikanten Unterschied sowohl im Kontroll-, als auch im Pseudarthrosengewebe nachweisbar war. Ebenfalls im kontrollierten Tiermodell waren in einer anderen Studie BMP-2/4/6/7 in der Pseudarthrosengruppe ab dem 10. postoperativen Tag signifikant reduziert <sup>213</sup>. Dies wurde als Hinweis dafür gewertet, dass Änderungen der BMP Regulation eher zu späteren Zeitpunkten stattfinden, welches den Beobachtungen aus den humanen Studien entspricht. Grundsätzlich zu erwähnen ist die Tatsache, dass die Ergebnisse aus standardisierten Tiermodellen nur eingeschränkt mit der jeweils individuellen klinischen Situation vergleichbar sind. Kloen et al. konnten bei der Aufarbeitung von humanem Pseudarthrosengewebe eine geringere Expression von BMP-2 zumindest für den kartilaginären Bereich der Pseudarthrosen nachweisen, während BMP-7, ähnlich unseren Daten, kaum messbar war <sup>101</sup>. Dem signifikant reduzierten PDGF-AB kann aktuell noch keine Relevanz zugeordnet werden. PDGF wird von Thrombozyten sezerniert und es kann im Frakturgewebe nachgewiesen werden <sup>214</sup>. Im Tiermodell konnte durch die Injektion von PDGF ein stimulativer Effekt auf die Knochenheilung demonstriert werden <sup>215</sup>. Seine konkrete Rolle in der Knochenheilung und für eventuelle therapeutische Anwendungen ist bis dato noch nicht geklärt <sup>99</sup>.

Überraschenderweise waren die BMP Inhibitoren Noggin und Sklerostin sowohl im regulären Frakturkallus, als auch im Pseudarthrosengewebe nicht unterschiedlich exprimiert. Dieses Phänomen konnte auch in anderen Studien mit humanem Gewebe beobachtet werden und könnte hinweisend dafür sein, dass gerade die Inhibitoren eine prominente Rolle im Entstehungsprozess von Pseudarthrosen spielen <sup>101, 216</sup>.

Trotz der Limitation einer eingeschränkten Vergleichbarkeit mit anderen Studien und der hohen Variabilität der Proben konzentrieren sich die Ergebnisse darauf, dass ein retrograder Ansatz, ausgehend von der Analyse des Pseudarthrosengewebes,

sinnvoll erscheint, um die Therapie zu optimieren. Es erscheint weiterhin sinnvoll die Strategie bei der lokalen Applikation ausblickend auf eine kombinierte Gabe von Wachstumsfaktoren zu erweitern und dabei auch den inhibitorischen Faktoren vermehrte Bedeutung beizumessen.

#### **5.4 Alternative Therapieansätze**

Das PDLLA hat in seiner Form als Beschichtung für Implantate die Kriterien für eine optimale Trägersubstanz erfüllt. Dessen Anwendung in Kombination mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- $\beta$ 1, BMP-2) hat sich in vitro und in vivo als einfach und praktikabel erwiesen<sup>95, 182, 184, 204</sup>. Die Erkenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen von Bone Morphogenetic Proteins sind mittlerweile solide und BMP-7 hat für therapieresistente Tibiaschaftpseudarthrosen bereits die klinische Zulassung. Dennoch bleiben die Ergebnisse der klinischen Anwendung hinter den Erwartungen, die aus den experimentellen Daten generiert wurden. Der Kostenfaktor stellt aktuell eine weitere Limitation für eine breite Anwendung dar. Im Rahmen eines Cochrane Database Reviews aus dem Jahr 2010 schien die Anwendung von BMPs gegenüber des autologen Knochentransfers, bei insgesamt höheren Therapiekosten, nicht überlegen zu sein<sup>217</sup>. Die klinische Dosis liegt 100-1000fach über der von endogenen BMPs und insbesondere die „off-label“ Anwendung hat zu Komplikationen geführt<sup>101, 102, 218, 219</sup>.

Daher sollte im Weiteren mit der Applikation von Bisphosphonaten über das bewährte Beschichtungskonzept ein neuartiger Ansatz zur Stimulation der Knochenheilung evaluiert werden. In eigenen Vorarbeiten wurden im Hinblick auf eine in vivo Therapie zunächst zellbiologische Untersuchungen an humanen Knochenzellen durchgeführt. In der Monokultur mit humanen Osteoblasten führten Implantate mit einer Zolendronat+PDLLA Beschichtung zu einem Anstieg der Typ-I Kollagensynthese (als Marker für die osteoblastäre Differenzierung) und der Sekretion von OPG, während die RANKL Expression vermindert war<sup>164</sup>. Auch andere Studien mit Zolendronat konnten diese Effekte nachweisen<sup>220, 221</sup>. Die Osteoklastenformation und -aktivität wurde durch das Zolendronat signifikant inhibiert<sup>158</sup>. Einen ähnlichen Effekt konnten Hughes et al. bereits 1989 nachweisen<sup>160</sup>. Aufgrund der Ergebnisse aus den Zellkulturen folgte die lokale Applikation in vivo. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inkorporation von Zolendronat in

die PDLLA-Implantatbeschichtung im etablierten Rattenmodell zu einer beschleunigten Heilung von Tibiafrakturen führt. Weder klinisch, noch laborchemisch konnten Hinweise für systemische Nebenwirkungen gefunden werden. Radiologisch zeigte sich nach 42 Tagen eine signifikant bessere Überbrückung der Frakturen in der ZOL-Gruppe. Nach 42 und 84 Tagen konnte eine signifikant größere Kallusfläche in der ZOL-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit unbeschichteten Implantaten und Implantaten mit reiner PDLLA-Beschichtung gemessen werden. Diese Ergebnisse wurden durch die biomechanische Testung unterstützt. Nach 42 Tagen war die torsionale Steifigkeit der ZOL-Gruppe um 134% und die maximale Versagenslast um 63% im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Interessanterweise blieb die mechanische Stabilität der ZOL-Gruppe bis zum 84. Tag fast konstant, während die Werte für die maximale Versagenslast und die torsionale Steifigkeit in beiden Kontrollgruppen (PDLLA-Beschichtung und unbeschichtete Implantate) sich der ZOL-Gruppe annäherten. Nur für die torsionale Steifigkeit konnten nach 84 Tage für die ZOL-Gruppe noch signifikant höhere Werte im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe gemessen werden, wobei zur PDLLA-Gruppe keine signifikanten Unterschiede mehr bestanden. Die lokale Applikation von Zolendronat führte in diesem Versuchsaufbau zusammenfassend also zu einer größeren Kallusfläche, welche wiederum zu einer höheren maximalen Versagenslast führte.

Die Knochenheilung stellt auf mehreren molekularen Ebenen einen eng regulierten Prozess von verschiedensten Signaltransduktionsmechanismen dar, welche prinzipiell anabole und katabole Heilungsphasen miteinander verknüpfen und koordinieren. Die anabole Phase wird durch die akute Entzündungsreaktion direkt nach einer Fraktur eingeleitet und führt über die Aktivierung von Osteoblasten zu einer Knochenneubildung. Auch eine katabole Reaktion wird mit der Fraktur eingeleitet und führt zur Resorption von sequestriertem Knochen und zum Remodeling von neugebildetem Knochen durch Osteoklasten<sup>222</sup>. Eine Störung in der Balance dieser Vorgänge kann letztlich zur verzögerten Heilung oder schließlich zur Pseudarthrose führen<sup>222</sup>. Während der grundlegende Ansatz der Therapie mit Wachstumsfaktoren, wie den Bone Morphogenetic Proteins, darin besteht, die anabole Reaktion zu triggern, bzw. zu verstärken, wirken die Bisphosphonate anti-katabol und stellen damit eine Art reversen Ansatz dar. Aufgrund der Tatsache, dass sich biomechanisch der initial stimulierende Effekt der ZOL-Gruppe nach 84 Tagen, bei jedoch verbliebenem Kallusvolumen, annähernd egalisierte, lässt schlussfolgern,

dass die lokale Applikation von Zolendronat zu einer Erhöhung der mechanischen Stabilität während der Frakturheilung führt. Grundlage hierfür stellt, entsprechend dem anti-katabolen Effekt des Zolendronats, eine temporäre Verzögerung des regulären Kallusremodelings dar.

Bisphosphonate sind in der Therapie der Osteoporose seit langem etabliert. Zolendronat hat seinen positiven Effekt auf die Knochenbilanz nach intravenöser Applikation in klinischen Studien bei Patienten mit transplantationsbedingter Osteoporose nach Leber- und Nierentransplantation zeigen können<sup>223, 224</sup>. In einer großen Phase III Studie konnte durch die jährliche Applikation von 5mg Zolendronat bei fast 7736 Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose eine signifikante Reduktion von Frakturaten von bis zu 77% beobachtet werden<sup>225</sup>. In einer anderen klinischen Studie konnte bei Patienten mit osteoporotischer Knochenstruktur nach Applikation von Bisphosphonaten eine höhere Ausdrehkraft von Fixationsschrauben nachgewiesen werden<sup>226</sup>. Die Inzidenz von Tibiaschaftfrakturen auf dem Boden einer postmenopausalen Osteoporose insbesondere bei >65jährigen Frauen und vor allem nach einfachen Stürzen auf ebenem Grund nimmt zu. Die Rate an Pseudarthrosen bei diesem Klientel wird mit 10% angegeben<sup>11</sup>. Vor diesem Hintergrund und wegen der reduzierten Knochendichte auch in der Fraktur- und/oder Pseudarthrosenregion könnte daher gerade für Patienten mit osteoporotischer Grundkondition die lokale Applikation von Bisphosphonaten interessant sein.

Der Einfluss von Bisphosphonaten auf die Implantateinheilung wurde bereits in vorangegangenen Studien in unterschiedlichsten Modellen untersucht. In einer frühen Studie von Pataki et al. zeigte die subkutane Injektion von Zolendronat bei Ratten zum Beispiel einen dosisabhängigen, positiven Einfluss auf die trabekuläre Knochenstruktur<sup>227</sup>. Die Injektion führte zu einer Zunahme trabekulären Knochens mit vermehrten Verbindungen untereinander. Die reduzierte Knochenresorption bei normaler Knochenneubildung führte letztlich zur positiven Knochenbilanz<sup>227</sup>. Verschiedenste Arbeitsgruppen konnten weiterhin den Nutzen der Bisphosphonate auch für den endoprothetischen Bereich darstellen. So zeigte eine Meta-Analyse, dass die systemische Applikation von Bisphosphonaten nach Hüft- und Knieprothesenimplantation bei den Patienten nach mittelfristigen Zeiträumen zu einer Reduktion des periprothetischen Knochenverlustes führt<sup>228</sup>. In einer aktuelleren Meta-Analyse konnten diese Ergebnisse unterstützt werden, wobei diese sich nicht für die langfristigen Zeiträume bestätigen ließen<sup>229</sup>. Darüber hinaus konnte in

tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden, dass nach systemischer Applikation die Osteointegration von Implantaten beschleunigt und verstärkt wird<sup>230</sup>. In der klinischen Anwendung konnte nach Knieprothesenimplantation eine deutlich reduzierte Migration der Komponenten nachgewiesen werden<sup>231</sup>.

Nicht alle Studien bezüglich des Einsatzes von Bisphosphonaten in der Fraktur- oder Knochendefektheilung zeigen einheitliche Ergebnisse. Allerdings finden sich in den Studien deutliche Unterschiede bezüglich der vorliegenden Anwendungsmodelle, der eingesetzten Substanzen, der Dosierung und des Zeitpunktes der Applikation, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist<sup>232-235</sup>. Zum Beispiel zeigen Amanat et al. im Frakturmodell der Ratte eine signifikant vermehrte Kallusformation, Knochenmineraldichte und biomechanische Stabilität durch eine verspätete Applikation von Zolendronat ein und zwei Wochen nach Trauma im Vergleich zur Applikation direkt nach Setzen der Fraktur<sup>232</sup>. Hingegen führte in der humanen Anwendung die Applikation von Zolendronat vier Wochen postoperativ nach tibialer Umstellungsosteotomie nicht zu einer Beschleunigung der Knochenheilung<sup>233</sup>. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Frage nach der Dosierung und des Timings der Applikation von den Umgebungsvariablen der zu behandelnden Pathologie abhängt. Das gewünschte Ziel der Behandlung wäre es, eine Verzögerung des Remodelings mit einer früheren Primärstabilität zu erreichen, ohne dabei dauerhaft die Umwandlung des Frakturkallus in reifen Knochen zu verhindern. Genau dies konnte in unserem Ansatz zumindest im Rattenmodell dargestellt werden. Dennoch muss die Anwendung der zugrunde liegenden Pathologie angepasst werden, und die Übertragung auf die klinische Situation kann nicht bedenkenlos gestaltet werden. Weitere experimentelle und klinische Studien sind daher notwendig, um das Konzept der lokalen Applikation von Bisphosphonaten über die PDLLA-Beschichtung für die Prävention und Therapie von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes in der humanen Anwendung anzupassen.

Die dargestellten Ansätze zur Optimierung der Knochenheilung bestehen in der Applikation von pro-anabolen Substanzen, wie dem Bone Morphogenetic Protein und der Anwendung von anti-katabolen Substanzen, wie dem Zolendronat. Aus dieser Diskussion heraus sind Ideen entstanden, welche die Synergieeffekte beider Ansätze miteinander verbinden und welche für die Behandlung von Pseudarthrosen relevant werden könnten. Die Arbeitsgruppe Tägil et al. konnte in einem

Pseudarthrosenmodell (Osteotomie von Rattenfemora) nachweisen, dass die kombinierte Applikation von lokalem BMP-7 und systemischen Zolendronat zusammen mit autologer Spongiosa nach 6 Wochen zu einer signifikant besseren mechanischen Belastbarkeit führte, im Vergleich zur Anlagerung von autologer Spongiosa allein oder in Kombination mit BMP-7<sup>236</sup>. Auch das Kallusvolumen war durch die Kombinationsgabe gegenüber beiden Kontrollgruppen signifikant erhöht<sup>236</sup>. Einen ähnlichen Effekt zeigte die Kombination von BMP-7 mit Zolendronat und allogener Spongiosa<sup>44</sup>. Gerade die Kombination mit auto- oder allogenen Knochentransplantaten oder -ersatzmaterialien stellt einen interessanten Ansatz dar, da deren Applikation einen Grundpfeiler in der Therapie von atrophen oder infizierten Pseudarthrosen darstellt.

Die Behandlung bei vorliegendem Infekt ist dabei von besonderer Bedeutung. Infektpseudarthrosen stellen die komplexeste Form der Pseudarthrosen dar. Sie beinhalten die meisten Revisionsoperationen und sind deutlich belastender für den Patienten<sup>237</sup>. Dementsprechend zeigen diese Patienten bezüglich des funktionellen Outcomes und der Lebensqualität schlechte Ergebnisse<sup>195</sup>. Vor zwei Hintergründen sollte daher die Kombination von dem Knochenersatzmaterial Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) mit verschiedenen Antibiotika untersucht werden. Erstens zur zielgerichteten, therapeutischen Anwendung bei der sekundären Knochendefektaugmentation bei infizierten Pseudarthrosen. Diese folgt regulär im infektfreien Intervall nach initialer Resektion von infiziertem Weichteil- und Knochengewebe<sup>46, 49</sup>. Zur Infekteradikation erfolgt, entsprechend des erhobenen Keimspektrums, eine begleitende systemische Antibiotikatherapie. Elegant scheint daher die Idee, im Sekundäreingriff das Knochenmaterial zur Füllung des Defektes perioperativ mit einem, dem Resistogramm gerechten Antibiotikum zu kombinieren. Die lokale Antibiotikagabe könnte somit protektiv auf das Knochenregenerat wirken. Während die Infektionsrate nach Primäreingriffen mit unter 2% angegeben wird, kann diese Rate im Revisionsfall bis auf 5-40% steigen<sup>238, 239</sup>. Vor diesem Hintergrund kann die lokale Antibiotikagabe über die vorgestellte Kombination mit DBM auch von prophylaktischem Nutzen, zum Beispiel bei der Versorgung von atrophen Pseudarthrosen sein.

Das vorgestellte Mischsystem zeichnete sich durch eine einfache Handhabung und die sichere Reproduzierbarkeit der Mischungen aus. Es konnte weiterhin eine solide Freisetzung und die antibiotische Wirkung der eingemischten Antibiotika Gentamicin,

Tobramycin und Vancomycin dargestellt werden. Darüber hinaus konnten keine zytotoxischen Effekte auf osteoblastäre Zellen durch die Freisetzung der Antibiotika nachgewiesen werden und diese Art der lokalen Applikation als sicher eingestuft werden. Vorangegangene Studien haben sich ebenfalls mit der Kombination von Antibiotika und Knochenersatzmaterialien beschäftigt<sup>240, 241</sup>. Allerdings enthalten diese Studien keine Informationen über die Mischprozedur oder es sind Schritte notwendig, die eine perioperative Anwendung unmöglich machen.

Nach wie vor stellt in der klinischen Praxis autologes Knochenmaterial für die Auffüllung von Knochendefekten den Goldstandard dar, da es eine solide Kombination aus osteokonduktivem Scaffold, osteoinduktiver Potenz und osteogenen Zellen bietet<sup>44, 45</sup>. Das Material bietet damit strukturelle Stabilität, einen biologischen Stimulus und es können keine Immunreaktionen ausgelöst werden. Allerdings bestehen auch einige Nachteile. Der häufigste Entnahmeort ist der Beckenkamm. Die Entnahme erfordert einen zusätzlichen operativen Eingriff und verlängert damit die Operationszeit. Weiterhin besteht nur eine limitierte Verfügbarkeit, so dass die Überbrückung größerer Defekte allein mit autologem Knochen oftmals nicht möglich ist. Grundsätzlich problematisch ist auch die Entnahmemorbidität, welche in bis zu 19% der Fälle beschrieben ist<sup>45</sup>. Zu den Komplikationen gehören Infektionen, postoperative Serom-/ Hämatombildungen, neurovaskuläre Begleitverletzungen, Frakturen, Hernienbildungen, kosmetische Probleme und chronische Schmerzzustände<sup>43, 45, 242</sup>. Pro Jahr werden in Deutschland circa 125.000 autologe Knochentransplantationen durchgeführt<sup>243</sup>. Die Prozedur ist mit relevanten Kosten verbunden, welche nach Auftreten von Komplikationen und bei der Notwendigkeit von Folgeoperationen entsprechend in die Höhe steigen können. Laut einer Untersuchung von Lohmann et al. sind daher die Kosten zwischen autologem Knochentransfer und Knochenersatzmaterial vergleichbar<sup>243</sup>. Das von uns verwandte Knochenersatzmaterial „Demineralisierte Knochenmatrix“ (DBM) stellt eine relevante Alternative zum autologen Knochen-transfer dar und wird häufig in der Unfallchirurgie und Orthopädie für verschiedenste Indikationen eingesetzt. Bei einem Markt in den U.S.A. von einer Milliarde Dollar per anno für Knochenersatzmaterialien stellt DBM (mit über 100.000 Anwendungen pro Jahr) einen 20-prozentigen Anteil dar<sup>244</sup>. DBM wird aus allogenen Spenderknochen gewonnen und besteht aus Kollagen, nicht-kollagenen Proteinen und Wachstumsfaktoren. DBM hat eine osteokonduktive und osteoinduktive Potenz und

die Anwendung gilt als sicher <sup>245 244</sup>. Im klinischen Einsatz konnte DBM bei der Versorgung von Pseudarthrosen im Vergleich zu autologer Beckenkammpongiosa bessere klinische Ergebnisse bezüglich Funktion und Patientenzufriedenheit zeigen <sup>246</sup>. In der spinalen Anwendung konnte hinsichtlich der Effektivität zumindest eine Gleichwertigkeit für DBM gegenüber autologem Knochen demonstriert werden <sup>247</sup>.

Darüber hinaus hat DBM seine Wirksamkeit in der Funktion als Trägersubstanz für die lokale Applikation von bioaktiven oder anti-infektiven Substanzen gezeigt <sup>240, 241, 248</sup>. Allerdings bleibt bei der Kombination mit Antibiotika zur anti-infektiven Prophylaxe unklar, über welchen Zeitraum eine Freisetzung der jeweiligen Antibiotika erforderlich ist. Holtom et al. konnten zum Beispiel bei der Therapie von offenen Frakturen keinen Unterschied zwischen einer Prophylaxe über ein oder fünf Tage feststellen, aber sie empfehlen die antibiotische Abdeckung über drei Tage, da hierfür in der Literatur gute Ergebnisse vorliegen <sup>249</sup>. In unserem Versuchsansatz konnte bei Mischung von 50mg/g DBM eine vollständige Freisetzung von Tobramycin und Gentamicin, sowie eine 60-prozentige Freisetzung von Vancomycin über drei Tage gezeigt werden, so dass dieser Ansatz für eine anti-infektive Prophylaxe im Rahmen der operativen Behandlung von tibialen Pseudarthrosen geeignet erscheint. Die protrahierte Freisetzung von Vancomycin (mit vollständigem Release bis zum 14. Tag) wurde auf das höhere Molekulargewicht zurückgeführt (ca. 2,5-fach höher gegenüber den anderen beiden Antibiotika). Da die Antibiotika durch Diffusion freigesetzt werden, diffundieren größere Moleküle langsamer <sup>250</sup>.

Die Anwendung zur Prophylaxe und Therapie von tibialen Pseudarthrosen scheint vielversprechend. Dennoch sind auf dieser Ebene weitere Untersuchungen notwendig, um in vivo die Biokompatibilität und die anti-infektive Effektivität nachzuweisen. Zur Erweiterung des Antibiotika-Portfolios im Rahmen der perioperativen Anwendung müssen weitere Antibiotika in dieser Kombination untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Inzidenz von Pseudarthrosen nach Frakturen im Bereich des Tibiaschaftes liegt in Abhängigkeit der initialen Traumacharakteristik bei 3-54%. Die Behandlung von Pseudarthrosen des Tibiaschaftes ist langwierig und stellt sowohl den behandelnden Chirurgen, als auch den Patienten vor eine anspruchsvolle Aufgabe. Wir konnten erstmals nachweisen, dass selbst bei erfolgreich therapierten Patienten mit einer adäquaten Knochen- und Weichteilheilung auch im Langzeitverlauf signifikante Einschränkungen bezüglich des funktionellen Outcomes und der Lebensqualität bestehen. Vor dem Hintergrund dieser Aspekte wurden experimentelle Ansätze zur Prophylaxe und Optimierung der Therapie vorgestellt und evaluiert.

Als neues Konzept wurde die lokale Applikation von bioaktiven Substanzen über eine Poly(D,L-laktid) Beschichtung (PDLLA) für Implantate eingeführt. Dabei fungiert das Implantat zum einen als mechanischer Stabilisator für die Fraktur, bzw. Pseudarthrose, und zum anderen als „Drugcarrier“ für pharmakologische Substanzen, mit der Potenz den Knochenstoffwechsel positiv zu beeinflussen. Das PDLLA stellt in seiner Form als Implantatbeschichtung das Bindeglied zwischen dem Implantat und dem Pharmakon dar. Während in Vorarbeiten die Biodegradierbarkeit und Freisetzungskinetik von Substanzen aus der Beschichtung bereits dargestellt wurde, konnte nun auch die Biokompatibilität nachgewiesen werden. Im ersten Ansatz wurde über das Konzept des bioaktiven Implantates ein non-viraler Gentransfer durchgeführt. Dafür wurden Copolymer-geschützte, für BMP-2 kodierende, DNA-Plasmide in die Implantatbeschichtung eingearbeitet und das Verfahren in einem etablierten Frakturmodell der Rattentibia hinsichtlich seiner Sicherheit und Effektivität beurteilt. Der Gentransfer führte zu keiner systemischen Distribution und konnte als sicher eingestuft werden. Es konnte eine transgene Expression von BMP-2 über den gesamten Versuchszeitraum nachgewiesen werden, wobei der stimulierende Effekt auf die Frakturheilung moderat war. In der folgenden Aufarbeitung humanen Pseudarthrosengewebes, inklusive der Konzentrationsbestimmung einzelner Wachstumsfaktoren, war die BMP-2 Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Die Wachstumsfaktoren BMP-7 und PDGF-AB waren im Vergleich zum Kallusgewebe aus regelhaft geheilten Frakturen vermindert, während gleichzeitig die BMP-Gegenregulatoren Noggin und Sklerostin

im Gewebe nachweisbar waren. Obgleich der Limitationen dieser Studie ergaben sich hieraus Gedanken hinsichtlich der Sinnhaftigkeit der Gabe einzelner BMPs zur Prophylaxe und Therapie von Pseudarthrosen im Kontext der bekannten, engen Regulation und Steuerung durch die Interaktion einer Vielzahl von molekularen Aktionspartnern. Während die BMPs einen pro-anabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel haben, sollte im nächsten Ansatz die Applikation von Bisphosphonaten, als anti-katabole Substanzgruppe, auf die Knochenheilung untersucht werden. Zolendronat ist als Bisphosphonat der dritten Generation für andere Indikationen bereits im breiten klinischen Einsatz. Mit dem etablierten Frakturmodell der Rattentibia sollte der Einfluss von Zolendronat in der bekannten PDLLA-Beschichtung auf die Knochenheilung untersucht werden. Das Ergebnis zeigte eine signifikant beschleunigte Frakturheilung mit erhöhten Kallusvolumina für die Zolendronat-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen nach 42 Tagen, während sich der Effekt nach 84 Tagen tendenziell nivellierte. Grundsätzlich könnte dieser Ansatz im Rahmen der Akutversorgung zur Prophylaxe von Tibiaschaftpseudarthrosen beitragen oder im Rahmen der operativen Therapie von manifesten, atrophen Pseudarthrosen einen sinnvollen Bestandteil darstellen, um die Knochenheilung positiv zu beeinflussen.

Mit der Fokussierung auf die prophylaktische Anwendung hinsichtlich der Ausbildung von postoperativen Infektionen bei der primären Knochendefektauffüllung bei atrophen Pseudarthrosen oder zum Schutz des Knochenregenerates bei der sekundären Defektauffüllung bei Infektpseudarthrosen wurde die Kombination des Knochenersatzmaterials DBM mit verschiedenen Antibiotika zur perioperativen Anwendung untersucht. Das Mischsystem erwies sich dabei als sicher und reliabel. Es konnten in vitro solide Freisetzungskinetiken von Tobramycin, Gentamicin und Vancomycin aus der DBM nachgewiesen werden. Die Antibiotika zeigten nach Freisetzung ihre biologische Aktivität und es konnten in der Zellkultur mit osteoblastären Zellen keine toxischen Nebenwirkungen gefunden werden. Das Konzept zeigt in vitro großes Potential und gerade die perioperative Anwendung könnte ein eleganter Baustein in der oftmals individualisierten Therapie von Tibiaschaftpseudarthrosen darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis.* 1997;56:63-72
2. Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury.* 2007;38 Suppl 2:S3-9
3. Busse JW, Morton E, Lacchetti C, Guyatt GH, Bhandari M. Current management of tibial shaft fractures: A survey of 450 canadian orthopedic trauma surgeons. *Acta Orthop.* 2008;79:689-694
4. Weiss RJ, Montgomery SM, Ehlin A, Al Dabbagh Z, Stark A, Jansson KA. Decreasing incidence of tibial shaft fractures between 1998 and 2004: Information based on 10,627 swedish inpatients. *Acta Orthop.* 2008;79:526-533
5. Court-Brown CM, Caesar BC. The epidemiology of fractures. . In: Rockwood DA; Green DP; Buchholz RW, eds. *Rockwood and green's fractures in adults.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010:53-85.
6. Grutter R, Cordey J, Buhler M, Johner R, Regazzoni P. The epidemiology of diaphyseal fractures of the tibia. *Injury.* 2000;31 Suppl 3:C64-67
7. Connelly CL, Bucknall V, Jenkins PJ, Court-Brown CM, McQueen MM, Biant LC. Outcome at 12 to 22 years of 1502 tibial shaft fractures. *Bone Joint J.* 2014;96-B:1370-1377
8. Emami A, Mjoberg B, Ragnarsson B, Larsson S. Changing epidemiology of tibial shaft fractures. 513 cases compared between 1971-1975 and 1986-1990. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:557-561
9. Bengner U, Ekblom T, Johnell O, Nilsson BE. Incidence of femoral and tibial shaft fractures. Epidemiology 1950-1983 in malmo, sweden. *Acta Orthop Scand.* 1990;61:251-254
10. Court-Brown CM, McBirnie J. The epidemiology of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br.* 1995;77:417-421
11. Clement ND, Beauchamp NJ, Duckworth AD, McQueen MM, Court-Brown CM. The outcome of tibial diaphyseal fractures in the elderly. *Bone Joint J.* 2013;95-B:1255-1262
12. Court-Brown CM, Rimmer S, Prakash U, McQueen MM. The epidemiology of open long bone fractures. *Injury.* 1998;29:529-534
13. Müller ME. The comprehensive classification of fractures of long bones. In: Müller ME, ed. *Manual of internal fixation.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer Verlag; 1991:118 ff.
14. Meling T, Harboe K, Enoksen CH, Aarflot M, Arthursson AJ, Soreide K. How reliable and accurate is the ao/ota comprehensive classification for adult long-bone fractures? *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73:224-231
15. Tscherne H, Oestern HJ. [a new classification of soft-tissue damage in open and closed fractures]. *Unfallheilkunde.* 1982;85:111-115

16. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: Retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am.* 1976;58:453-458
17. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type iii (severe) open fractures: A new classification of type iii open fractures. *J Trauma.* 1984;24:742-746
18. Krettek C. [fracture and soft tissue damage]. *Chirurg.* 1998;69:684-700
19. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:940-956
20. Frolke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury.* 2007;38 Suppl 2:S19-22
21. Rosen H. Compression treatment of long bone pseudarthroses. *Clin Orthop Relat Res.* 1979:154-166
22. Weber BG, Cech O. *Pseudoarthrosis: Pathology, biomechanics, therapy, results.* Berne, Switzerland: Hans Huber Medical Publisher; 1976.
23. Biasibetti A, Aloj D, Di Gregorio G, Masse A, Salomone C. Mechanical and biological treatment of long bone non-unions. *Injury.* 2005;36 Suppl 4:S45-50
24. Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Tornetta P, 3rd, Sprague S, Schemitsch EH. A lack of consensus in the assessment of fracture healing among orthopaedic surgeons. *J Orthop Trauma.* 2002;16:562-566
25. Brinker MR, O'Connor DP. Nonunions: Evaluation and treatment. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, eds. *Skeletal trauma: Basic science, management, and reconstruction.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2009:615-708.
26. McKee MD, Ochsner PE. Aseptic nonunion. In: Ruedi T, Buckley RC, Moran CG, eds. *Ao principles of fracture management* Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2007.
27. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: Need for a new scoring system? *Injury.* 2008;39 Suppl 2:S59-63
28. Khatod M, Botte MJ, Hoyt DB, Meyer RS, Smith JM, Akeson WH. Outcomes in open tibia fractures: Relationship between delay in treatment and infection. *J Trauma.* 2003;55:949-954
29. Gustilo RB, Anderson JT. Jsbs classics. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones. Retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A:682
30. Fong K, Truong V, Foote CJ, Petrisor B, Williams D, Ristevski B, et al. Predictors of nonunion and reoperation in patients with fractures of the tibia: An observational study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:103
31. Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: Management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie.* 2000;43:256-262

32. Yusof NM, Khalid KA, Zulkifly AH, Zakaria Z, Amin MA, Awang MS, et al. Factors associated with the outcome of open tibial fractures. *Malays J Med Sci.* 2013;20:47-53
33. Keating JF, O'Brien PJ, Blachut PA, Meek RN, Broekhuysse HM. Locking intramedullary nailing with and without reaming for open fractures of the tibial shaft. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79:334-341
34. Finkemeier CG, Schmidt AH, Kyle RF, Templeman DC, Varecka TF. A prospective, randomized study of intramedullary nails inserted with and without reaming for the treatment of open and closed fractures of the tibial shaft. *Journal of orthopaedic trauma.* 2000;14:187-193
35. Collinge C, Kuper M, Larson K, Protzman R. Minimally invasive plating of high-energy metaphyseal distal tibia fractures. *J Orthop Trauma.* 2007;21:355-361
36. Brinker MR, Hanus BD, Sen M, O'Connor DP. The devastating effects of tibial nonunion on health-related quality of life. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:2170-2176
37. Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Schemitsch EH. Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83:62-68
38. Papakostidis C, Kanakaris NK, Pretel J, Faour O, Morell DJ, Giannoudis PV. Prevalence of complications of open tibial shaft fractures stratified as per the Gustilo-Anderson classification. *Injury.* 2011;42:1408-1415
39. Beardi J, Hessmann M, Hansen M, Rommens PM. Operative treatment of tibial shaft fractures: A comparison of different methods of primary stabilisation. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008;128:709-715
40. Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D. Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin Orthop Relat Res.* 1994:189-193
41. Paley D, Catagni MA, Argnani F, Villa A, Benedetti GB, Cattaneo R. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clin Orthop Relat Res.* 1989:146-165
42. Cech O, Marti RK. Evolution of treatment of nonunions. In: Marti RK, Kloen P, eds. *Concepts and cases in nonunion treatment.* Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2011:21-46.
43. Jones CB, Mayo KA. Nonunion treatment: Iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma.* 2005;19:S11-13
44. Mathavan N, Bosemark P, Isaksson H, Tagil M. Investigating the synergistic efficacy of bmp-7 and zoledronate on bone allografts using an open rat osteotomy model. *Bone.* 2013;56:440-448
45. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the ria: A systematic review. *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S3-15
46. Johnson EE, Buckley RC. Chronic infection and septic nonunion. In: Ruedi T, Buckley RC, Moran CG, eds. *Ao principles of fracture management.* Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2007.

47. Patzakis MJ, Zalavras CG. Chronic posttraumatic osteomyelitis and infected nonunion of the tibia: Current management concepts. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13:417-427
48. Shahcheraghi GH, Bayatpoor A. Infected tibial nonunion. *Can J Surg.* 1994;37:209-213
49. Jain AK, Sinha S. Infected nonunion of the long bones. *Clin Orthop Relat Res.* 2005:57-65
50. Knobloch K, Vogt PM. [the reconstructive sequence in the 21st century. A reconstructive clockwork]. *Chirurg.* 2010;81:441-446
51. Megas P, Saridis A, Kouzelis A, Kallivokas A, Mylonas S, Tyllianakis M. The treatment of infected nonunion of the tibia following intramedullary nailing by the ilizarov method. *Injury.* 2010;41:294-299
52. Soucacos PN, Dailiana Z, Beris AE, Johnson EO. Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury.* 2006;37 Suppl 1:S41-50
53. Belt PJ, Dickinson IC, Theile DR. Vascularised free fibular flap in bone resection and reconstruction. *Br J Plast Surg.* 2005;58:425-430
54. Maini L, Chadha M, Vishwanath J, Kapoor S, Mehtani A, Dhaon BK. The ilizarov method in infected nonunion of fractures. *Injury.* 2000;31:509-517
55. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury.* 2007;38 Suppl 2:S11-18
56. Day SM, DeHeer DH. Reversal of the detrimental effects of chronic protein malnutrition on long bone fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2001;15:47-53
57. Guarniero R, de Barros Filho TE, Tannuri U, Rodrigues CJ, Rossi JD. Study of fracture healing in protein malnutrition. *Revista paulista de medicina.* 1992;110:63-68
58. Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J. Abnormalities in fracture healing induced by vitamin b6-deficiency in rats. *Bone.* 1986;7:489-495
59. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL, et al. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.).* 2005;36:201-214
60. Perlman MH, Thordarson DB. Ankle fusion in a high risk population: An assessment of nonunion risk factors. *Foot Ankle Int.* 1999;20:491-496
61. Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Guner G, et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcoholism, clinical and experimental research.* 2002;26:509-513
62. Moghaddam-Alvandi A, Zimmermann G, Hammer K, Bruckner T, Grutzner PA, von Recum J. Cigarette smoking influences the clinical and occupational outcome of patients with tibial shaft fractures. *Injury.* 2013;44:1670-1671
63. Schmitz MA, Finnegan M, Natarajan R, Champine J. Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1999:184-200
64. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am.* 1989;71:722-733

65. Manolagas SC, Weinstein RS. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14:1061-1066
66. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand*. 2000;71:316-321
67. Giannoudis PV, MacDonald DA, Matthews SJ, Smith RM, Furlong AJ, De Boer P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bone Joint Surg Br*. 2000;82:655-658
68. Altman RD, Latta LL, Keer R, Renfree K, Hornicek FJ, Banovac K. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: A laboratory study in rats. *J Orthop Trauma*. 1995;9:392-400
69. Dimitriou R, Kanakaris N, Soucacos PN, Giannoudis PV. Genetic predisposition to non-union: Evidence today. *Injury*. 2013;44 Suppl 1:S50-53
70. Zeckey C, Hildebrand F, Glaubitz LM, Jurgens S, Ludwig T, Andruszkow H, et al. Are polymorphisms of molecules involved in bone healing correlated to aseptic femoral and tibial shaft non-unions? *J Orthop Res*. 2011;29:1724-1731
71. Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: A case control study of a preliminary single nucleotide polymorphisms analysis of the bmp pathway. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:44
72. Harley BJ, Beaupre LA, Jones CA, Dulai SK, Weber DW. The effect of time to definitive treatment on the rate of nonunion and infection in open fractures. *J Orthop Trauma*. 2002;16:484-490
73. Chatziyiannakis AA, Verettas DA, Raptis VK, Charpantitis ST. Nonunion of tibial fractures treated with external fixation. Contributing factors studied in 71 fractures. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1997;275:77-79
74. Court-Brown CM, Keating JF, Christie J, McQueen MM. Exchange intramedullary nailing. Its use in aseptic tibial nonunion. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77:407-411
75. Megas P. Classification of non-union. *Injury*. 2005;36 Suppl 4:S30-37
76. Triffitt PD, Gregg PJ. Depression of bone blood flow after blunt trauma. A fracture study in the adult rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1994;65:195-198
77. Fassbender M, Strobel C, Rauhe JS, Bergmann C, Schmidmaier G, Wildemann B. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *European cells & materials*. 2011;22:1-11
78. Schwabe P, Haas NP, Schaser KD. [fractures of the extremities with severe open soft tissue damage. Initial management and reconstructive treatment strategies]. *Unfallchirurg*. 2010;113:647-670; quiz 671-642
79. Shadgan B, Menon M, O'Brien PJ, Reid WD. Diagnostic techniques in acute compartment syndrome of the leg. *J Orthop Trauma*. 2008;22:581-587
80. Park S, Ahn J, Gee AO, Kuntz AF, Esterhai JL. Compartment syndrome in tibial fractures. *J Orthop Trauma*. 2009;23:514-518

81. Woll TS, Duwelius PJ. The segmental tibial fracture. *Clin Orthop Relat Res*. 1992;204-207
82. Blick SS, Brumback RJ, Poka A, Burgess AR, Ebraheim NA. Compartment syndrome in open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Am*. 1986;68:1348-1353
83. Koval KJ, Clapper MF, Brumback RJ, Ellison PS, Jr., Poka A, Bathon GH, et al. Complications of reamed intramedullary nailing of the tibia. *J Orthop Trauma*. 1991;5:184-189
84. Tornetta P, 3rd, Templeman D. Compartment syndrome associated with tibial fracture. *Instr Course Lect*. 1997;46:303-308
85. Reverte MM, Dimitriou R, Kanakaris NK, Giannoudis PV. What is the effect of compartment syndrome and fasciotomies on fracture healing in tibial fractures? *Injury*. 2011;42:1402-1407
86. Bhandari M, Tornetta P, 3rd, Sprague S, Najibi S, Petrisor B, Griffith L, et al. Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *Journal of orthopaedic trauma*. 2003;17:353-361
87. Gaebler C, Berger U, Schandelmaier P, Greitbauer M, Schauwecker HH, Applegate B, et al. Rates and odds ratios for complications in closed and open tibial fractures treated with unreamed, small diameter tibial nails: A multicenter analysis of 467 cases. *J Orthop Trauma*. 2001;15:415-423
88. Runkel M, Rommens PM. [pseudoarthrosis]. *Unfallchirurg*. 2000;103:51-63
89. Perumal V, Roberts CS. Factors contributing to non-union of fractures. *Current Orthopaedics*. 2007;258-261
90. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S3-6
91. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept-open questions. *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S5-8
92. Fassbender M, Minkwitz S, Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (bmp-2) delivery. *International journal of molecular sciences*. 2014;15:8539-8552
93. Schwabe P, Greiner S, Ganzert R, Eberhart J, Dahn K, Stemberger A, et al. Effect of a novel nonviral gene delivery of bmp-2 on bone healing. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:560142
94. Schmidmaier G, Schwabe P, Wildemann B, Haas NP. Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S35-41
95. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. 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
96. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87:1367-1378

97. Ruschke K, Hiepen C, Becker J, Knaus P. Bmps are mediators in tissue crosstalk of the regenerating musculoskeletal system. *Cell and tissue research*. 2012;347:521-544
98. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*. 1996:39-46
99. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-a:1032-1044
100. Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20:481-488
101. Kloen P, Lauzier D, Hamdy RC. Co-expression of bmps and bmp-inhibitors in human fractures and non-unions. *Bone*. 2012;51:59-68
102. Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S1-3
103. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893-899
104. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*. 1988;242:1528-1534
105. Massague J. How cells read tf-beta signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2000;1:169-178
106. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362:550-553
107. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. Tgf-beta signalling from cell membrane to nucleus through smad proteins. *Nature*. 1997;390:465-471
108. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cellular signalling*. 2011;23:609-620
109. Alaoui-Ismaili MH, Falb D. Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20:501-507
110. Bramlage CP, Haupl T, Kaps C, Bramlage P, Muller GA, Strutz F. [bone morphogenetic proteins in the skeletal system]. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 2005;64:416-422
111. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Current opinion in genetics & development*. 1996;6:432-438
112. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone morphogenetic protein (bmp) signaling in development and human diseases. *Genes & diseases*. 2014;1:87-105
113. Yoshikawa H, Nakase T, Myoui A, Ueda T. Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J Orthop Sci*. 2004;9:334-340
114. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998:26-37

115. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone*. 1998;22:591-603
116. Azari K, Doll BA, Sfeir C, Mu Y, Hollinger JO. Therapeutic potential of bone morphogenetic proteins. *Expert opinion on investigational drugs*. 2001;10:1677-1686
117. Ohura K, Hamanishi C, Tanaka S, Matsuda N. Healing of segmental bone defects in rats induced by a beta-tcp-mcpm cement combined with rhbmp-2. *Journal of biomedical materials research*. 1999;44:168-175
118. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhbmp-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 1992;74:659-670
119. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS, 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:827-838
120. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res*. 1994:302-312
121. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:734-750
122. Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzini A, Lindholm TC, et al. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int Orthop*. 1997;21:194-200
123. Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Bovine-derived bone protein as a bone graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Trauma*. 1997;11:496-508
124. Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO. Bone formation with use of rhbmp-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79:1778-1790
125. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, Schelling SH, Carmel LA. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res*. 1998:205-217
126. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, 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
127. den Boer FC, Bramer JA, Blokhuis TJ, Van Soest EJ, Jenner JM, Patka P, et al. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone*. 2002;31:158-164
128. Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcified tissue international*. 1999;65:83-89

129. Blokhuis TJ, den Boer FC, Bramer JA, Jenner JM, Bakker FC, Patka P, et al. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials*. 2001;22:725-730
130. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1988:249-257
131. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hbmp). *Clin Orthop Relat Res*. 1990:234-240
132. Johnson EE, Urist MR. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop Relat Res*. 2000:61-74
133. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of op-1 bone morphogenetic protein (bmp-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81:710-718
134. Pecina M, Haspl M, Jelic M, Vukicevic S. Repair of a resistant tibial non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-bmp-7). *Int Orthop*. 2003;27:320-321
135. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rhbmp-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: A preliminary report. *Spine*. 2000;25:376-381
136. Johnsson R, Stromqvist B, Aspenberg P. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (bmp-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 volvo award in clinical studies. *Spine*. 2002;27:2654-2661
137. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1:S151-158
138. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, 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
139. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1258-1265
140. Kloen P. Emerging treatments for fractures and nonunions - growth factors and beyond. In: Marti RK, Kloen P, eds. *Concepts and cases in nonunion treatment*. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag; 2011:67-74.
141. Kanakaris NK, Lasanianos N, Calori GM, Verdonk R, Blokhuis TJ, Cherubino P, et al. Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: A 4-year multicentre experience. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S54-61
142. Calori GM, Tagliabue L, Gala L, d'Imporzano M, Peretti G, Albisetti W. Application of rhbmp-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: A prospective randomised clinical study on 120 patients. *Injury*. 2008;39:1391-1402

143. Dimitriou R, Dahabreh Z, Katsoulis E, Matthews SJ, Branfoot T, Giannoudis PV. Application of recombinant bmp-7 on persistent upper and lower limb non-unions. *Injury*. 2005;36 Suppl 4:S51-59
144. Bong MR, Capla EL, Egol KA, Sorkin AT, Distefano M, Buckle R, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) combined with various adjuncts in the treatment of humeral diaphyseal nonunions. *Bull Hosp Jt Dis*. 2005;63:20-23
145. Moghaddam A, Elleser C, Biglari B, Wentzensen A, Zimmermann G. Clinical application of bmp 7 in long bone non-unions. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010;130:71-76
146. Giannoudis PV, Psarakis S, Kanakaris NK, Pape HC. Biological enhancement of bone healing with bone morphogenetic protein-7 at the clinical setting of pelvic girdle non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S43-48
147. Kanakaris NK, Mallina R, Calori GM, Kontakis G, Giannoudis PV. Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: Clinical results. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S62-66
148. Russell RG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*. 2011;49:2-19
149. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49:34-41
150. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Current opinion in pharmacology*. 2006;6:307-312
151. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des*. 2003;9:2643-2658
152. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2008;19:733-759
153. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebetino FH, Rogers MJ. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*. 2008;42:848-860
154. Van Beek E, Lowik C, Que I, Papapoulos S. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11:1492-1497
155. Papapoulos SE. Bisphosphonates: How do they work? *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. 2008;22:831-847
156. Li EC, Davis LE. Zoledronic acid: A new parenteral bisphosphonate. *Clinical therapeutics*. 2003;25:2669-2708
157. Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous atp analog (appi) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ant) and is responsible for the

- apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol*. 2006;147:437-445
158. Greiner S, Kadow-Romacker A, Wildemann B, Schwabe P, Schmidmaier G. Bisphosphonates incorporated in a poly(d,l-lactide) implant coating inhibit osteoclast like cells in vitro. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2007;83:1184-1191
  159. Lowik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: The effect of a bisphosphonate. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1988;3:185-192
  160. Hughes DE, MacDonald BR, Russell RG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest*. 1989;83:1930-1935
  161. Bellido T, Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone*. 2011;49:50-55
  162. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest*. 1999;104:1363-1374
  163. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of rankl presentation to osteoclast precursors. *Current osteoporosis reports*. 2014;12:115-120
  164. Greiner S, Kadow-Romacker A, Lubberstedt M, Schmidmaier G, Wildemann B. The effect of zoledronic acid incorporated in a poly(d,l-lactide) implant coating on osteoblasts in vitro. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2007;80:769-775
  165. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291:680-686
  166. Gamsjaeger S, Buchinger B, Zwettler E, Recker R, Black D, Gasser JA, et al. Bone material properties in actively bone-forming trabeculae in postmenopausal women with osteoporosis after three years of treatment with once-yearly zoledronic acid. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26:12-18
  167. Reid IR, Miller P, Lyles K, Fraser W, Brown JP, Saidi Y, et al. Comparison of a single infusion of zoledronic acid with risedronate for paget's disease. *N Engl J Med*. 2005;353:898-908
  168. Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhbmp-2. *Advanced drug delivery reviews*. 2003;55:1613-1629
  169. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, et al. Effect of bmp-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene therapy*. 2006;13:1290-1299

170. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone*. 1999;24:541-547
171. Lieberman JR, Le LQ, Wu L, Finerman GA, Berk A, Witte ON, et al. Regional gene therapy with a bmp-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*. 1998;16:330-339
172. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 1999;81:905-917
173. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, et al. Genetic enhancement of fracture repair: Healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the bmp-2 gene. *Gene therapy*. 2000;7:734-739
174. Phillips JE, Gersbach CA, Garcia AJ. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials*. 2007;28:211-229
175. Somia N, Verma IM. Gene therapy: Trials and tribulations. *Nature reviews. Genetics*. 2000;1:91-99
176. Crystal RG. Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success. *Science*. 1995;270:404-410
177. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature*. 1998;392:25-30
178. Carofino BC, Lieberman JR. Gene therapy applications for fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:99-110
179. Baltzer AW, Lieberman JR. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene therapy*. 2004;11:344-350
180. Busse JW, Bhandari M, Sprague S, Johnson-Masotti AP, Gafni A. An economic analysis of management strategies for closed and open grade i tibial shaft fractures. *Acta Orthop*. 2005;76:705-712
181. Zeckey C, Mommsen P, Andruszkow H, Macke C, Frink M, Stubig T, et al. The aseptic femoral and tibial shaft non-union in healthy patients - an analysis of the health-related quality of life and the socioeconomic outcome. *The open orthopaedics journal*. 2011;5:193-197
182. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, 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
183. Athanasiou KA, Agrawal CM, Barber FA, Burkhart SS. Orthopaedic applications for pla-pga biodegradable polymers. *Arthroscopy*. 1998;14:726-737
184. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(d,l-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *Journal of biomedical materials research*. 2001;58:449-455

185. Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for gtr and gbr applications. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1996;11:667-678
186. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, et al. Long-term effects of local growth factor (igf-i and tgf-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res*. 2004;22:514-519
187. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res*. 2002:110-120
188. Lauzon MA, Bergeron E, Marcos B, Fauchoux N. Bone repair: New developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;162:502-520
189. Poynton AR, Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine*. 2002;27:S40-48
190. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16:329-345
191. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of dental research*. 2008;87:107-118
192. Greiner S, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B. Cocultures of osteoblasts and osteoclasts are influenced by local application of zoledronic acid incorporated in a poly(d,l-lactide) implant coating. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2009;91:288-295
193. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: A review. *The Indian journal of medical research*. 2010;132:15-30
194. Bode G, Strohm PC, Sudkamp NP, Hammer TO. Tibial shaft fractures - management and treatment options. A review of the current literature. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2012;79:499-505
195. Bowen CV, Botsford DJ, Hudak PL, Evans PJ. Microsurgical treatment of septic nonunion of the tibia. Quality of life results. *Clin Orthop Relat Res*. 1996:52-61
196. Shahid M, Hussain A, Bridgeman P, Bose D. Clinical outcomes of the ilizarov method after an infected tibial non union. *Archives of trauma research*. 2013;2:71-75
197. Kanakaris NK, Paliobeis C, Nlanidakis N, Giannoudis PV. Biological enhancement of tibial diaphyseal aseptic non-unions: The efficacy of autologous bone grafting, bmps and reaming by-products. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S65-75
198. Hollinger JO, Uludag H, Winn SR. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Advanced drug delivery reviews*. 1998;31:303-318

199. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG, Muller R, Hubbell JA. Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. *Biotechnology and bioengineering*. 2004;86:27-36
200. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *Journal of biomedical materials research*. 1971;5:169-181
201. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*. 1999:S95-106
202. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J. Characterization of rhbmp-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *Journal of biomedical materials research*. 1999;46:193-202
203. Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. 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
204. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, Raschke M. Igf-i and tgf-beta 1 incorporated in a poly(d,l-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2003;65:157-162
205. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: In vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing bmp7. *Journal of cellular biochemistry*. 2000;78:476-486
206. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Braunstein S, Robbins PD, Evans CH. A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a new zealand white rabbit model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1999;7:197-202
207. Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature medicine*. 1996;2:545-550
208. Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, Mattoon JS, Weisbrode SE, Bartlett JS, et al. Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human bmp-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res*. 2008;26:764-771
209. Stolberg SG. The biotech death of jesse gelsinger. *The New York times magazine*. 1999:136-140, 149-150
210. Fang J, Zhu YY, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5753-5758
211. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: Prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nature medicine*. 1999;5:753-759
212. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury*. 2001;32:519-524

213. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of bmp gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res.* 2006;24:1463-1471
214. Andrew JG, Hoyland JA, Freemont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone.* 1995;16:455-460
215. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994;15:203-208
216. Kwong FN, Hoyland JA, Freemont AJ, Evans CH. Altered relative expression of bmps and bmp inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res.* 2009;27:752-757
217. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (bmp) for fracture healing in adults. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2010:Cd006950
218. Argintar E, Edwards S, Delahay J. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Injury.* 2011;42:730-734
219. Woo EJ. Adverse events after recombinant human bmp2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471:1707-1711
220. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer research.* 2000;60:6001-6007
221. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences rankl expression in human osteoblast-like cells by activating tnf-alpha converting enzyme (tace). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2004;19:147-154
222. Little DG, Ramachandran M, Schindeler A. The anabolic and catabolic responses in bone repair. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89:425-433
223. Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, Kletzmayer J, Schwarz C, Mitterbauer C, et al. Zoledronic acid to prevent bone loss in the first 6 months after renal transplantation. *Kidney Int.* 2003;63:1130-1136
224. Misof BM, Bodingbauer M, Roschger P, Wekerle T, Pakrah B, Haas M, et al. Short-term effects of high-dose zoledronic acid treatment on bone mineralization density distribution after orthotopic liver transplantation. *Calcified tissue international.* 2008;83:167-175
225. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356:1809-1822
226. Moroni A, Faldini C, Hoang-Kim A, Pegreffo F, Giannini S. Alendronate improves screw fixation in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:96-101
227. Pataki A, Muller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: A comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *The Anatomical record.* 1997;249:458-468

228. Lin T, Yan SG, Cai XZ, Ying ZM. Bisphosphonates for periprosthetic bone loss after joint arthroplasty: A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23:1823-1834
229. Zhu L, Zheng W, Zhao FC, Guo Y, Meng BY, Liu HT, et al. A meta-analysis of bisphosphonates for periprosthetic bone loss after total joint arthroplasty. *J Orthop Sci*. 2013;18:762-773
230. Hilding M, Ryd L, Toksvig-Larsen S, Aspenberg P. Clodronate prevents prosthetic migration: A randomized radiostereometric study of 50 total knee patients. *Acta Orthop Scand*. 2000;71:553-557
231. Eberhardt C, Habermann B, Muller S, Schwarz M, Bauss F, Kurth AH. The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model. *J Orthop Sci*. 2007;12:61-66
232. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007;22:867-876
233. Harding AK, A WD, Geijer M, Toksvig-Larsen S, Tagil M. A single bisphosphonate infusion does not accelerate fracture healing in high tibial osteotomies. *Acta Orthop*. 2011;82:465-470
234. Bodde EW, Kowalski RS, Spauwen PH, Jansen JA. No increased bone formation around alendronate or omeprazole loaded bioactive bone cements in a femoral defect. *Tissue engineering. Part A*. 2008;14:29-39
235. Matos MA, Tannuri U, Guarniero R. The effect of zoledronate during bone healing. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology*. 2010;11:7-12
236. Bosemark P, Isaksson H, McDonald MM, Little DG, Tagil M. Augmentation of autologous bone graft by a combination of bone morphogenic protein and bisphosphonate increased both callus volume and strength. *Acta Orthop*. 2013;84:106-111
237. Wichlas F, Tsitsilonis S, Disch AC, Haas NP, Hartmann C, Graef F, et al. Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions. *Int Orthop*. 2014
238. Trampuz A, Widmer AF. Infections associated with orthopedic implants. *Current opinion in infectious diseases*. 2006;19:349-356
239. Miclau T, Schmidt AH, Wenke JC, Webb LX, Harro JM, Prabhakara R, et al. Infection. *J Orthop Trauma*. 2010;24:583-586
240. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell and tissue banking*. 2012;13:119-127
241. Rhyu KH, Jung MH, Yoo JJ, Lee MC, Seong SC, Kim HJ. In vitro release of vancomycin from vancomycin-loaded blood coated demineralised bone. *Int Orthop*. 2003;27:53-55

242. Nodarian T, Sariali E, Khiami F, Pascal-Mousselard H, Catonne Y. Iliac crest bone graft harvesting complications: A case of liver herniation. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2010;96:593-596
243. Lohmann H, Grass G, Rangger C, Mathiak G. Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127:345-348
244. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:1063-1077
245. Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, Patel T, Thalgott JS, Truumees E, et al. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2002;2:206-215
246. Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, Loffler T, Rubenbauer B, Trentzsch H, et al. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *Journal of trauma management & outcomes*. 2009;3:11
247. Aghdasi B, Montgomery SR, Daubs MD, Wang JC. A review of demineralized bone matrices for spinal fusion: The evidence for efficacy. *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. 2013;11:39-48
248. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:1123-1128
249. Holtom PD, Patzakis MJ. Newer methods of antimicrobial delivery for bone and joint infections. *Instr Course Lect*. 2003;52:745-749
250. Bormann N, Schwabe P, Smith MD, Wildemann B. Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure. *Bone*. 2014;59:162-172

## **8 Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Chef, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert P. Haas, für die wertvolle klinische und wissenschaftliche Ausbildung, das uneingeschränkte Vertrauen und die Möglichkeit meine wissenschaftlichen Untersuchungen im Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie durchführen zu dürfen.

In Freundschaft verbunden, danke ich zutiefst Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser. Mit seiner analytischen Art und seiner enormen klinischen, wie chirurgischen Expertise hat er mich maßgeblich chirurgisch und wissenschaftlich geprägt. Er hat damit ausschlaggebend zum Erfolg meiner chirurgischen und wissenschaftlichen Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich ganz herzlich für sein vollstes Vertrauen und die einzigartige Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ferner gilt mein ganz besonderer Dank Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann, die von Anfang bis jetzt meinen wissenschaftlichen Weg begleitet hat und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier, Leiter der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg. Erst die vielfältige und tatkräftige Unterstützung der Beiden hat zum Gelingen dieser Arbeit geführt.

Meinem Freund und Kollegen, Herrn Dr. med. Sven Märdian, möchte ich ganz herzlich für die zahlreichen Anregungen, die tatkräftige Unterstützung bei der Planung, Ausführung und Auswertung der Studien danken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung und des Julius Wolff Institutes, insbesondere Frau Dipl.-Ing. Biotech. Nicole Bormann, Frau Gabriela Hartung und Frau Marzena Princ für die wertvolle Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Ferner danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda, Leiter des Julius Wolff Institutes für die uneingeschränkte Möglichkeit meine wissenschaftlichen Arbeiten durchzuführen.

Ferner gilt mein Dank und meine Anerkennung allen ehemaligen und noch tätigen Doktoranden, Frau Ricarda Ganzert, Frau Jana Eberhardt, Frau Kerstin Dähn, Herrn Felix Landmann, Frau Pia Hinz, Herrn Silvan Wittenberg für die Zeit und die Leidenschaft, die sie in die Durchführung der klinischen und experimentellen Untersuchungen investiert haben.

Meinem klinischen Mentor für die Tumorchirurgie, Dr. med. Ingo Melcher, Sektionsleiter der Muskuloskeletalen Tumorchirurgie, bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet. Seine einzigartige Erfahrung und sein Vertrauen in meine Person haben mich immer inspiriert und außerordentlich motiviert.

Danken möchte ich ebenso allen Kolleginnen und Kollegen des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, vor allem Herrn Dr. med. Serafeim Tsitsilonis, Herrn Dr. med. Florian Wichlas und Herrn PD Dr. med. Alexander Disch, für die geleistete Unterstützung.

Der allergrößte Dank gilt meiner gesamten Familie, allen voran jedoch meiner Frau Karola mit Niklas und Sophia – für die grandiose Unterstützung und das endlose Verständnis für meine Arbeit!

## 8.2 Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum

Dr. med. Philipp Schwabe