

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
und dem Julius Wolff Institut  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Eine histomorphometrische Evaluation des Einflusses eines  
lokal applizierten Bisphosphonats (Zoledronat)  
auf die Frakturheilung am Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mahtala Thiele

---

Datum der Promotion

26.06.2022



## **Vorwort**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G. "Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats.", *Acta Orthopaedica*, Oktober 2008 (1).



# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	5
2	Abbildungsverzeichnis.....	7
3	Tabellenverzeichnis.....	9
4	Abkürzungsverzeichnis .....	10
5	Abstrakt.....	12
6	Einleitung .....	16
6.1	Knochen.....	17
6.2	Erkrankungen des Knochenstoffwechsels .....	20
6.3	Frakturheilung.....	22
6.4	Gestörte Frakturheilung .....	24
6.5	Bisphosphonate .....	24
6.6	Applikationsform .....	30
6.7	Zielstellung.....	31
6.8	Die Arbeitshypothese.....	31
7	Material und Methoden.....	32
7.1	Material.....	32
7.2	Methoden.....	34
7.3	Statistik .....	50
8	Ergebnisse .....	51
8.1	Peri- und ostoperativer Verlauf .....	51
8.2	Histologische und histomorphometrische Beurteilung .....	52
9	Diskussion.....	67
9.1	Ergebnisse und deren Einordnung .....	67
9.2	Verhältnis zur biomechanischen Untersuchung.....	70
9.3	Kallusflächen .....	70

## Inhaltsverzeichnis

---

9.4	Frakturmodell.....	71
9.5	Versuchstiermodell .....	72
9.6	Osteosyntheseverfahren.....	74
9.7	Beschichtung .....	75
9.8	Bisphosphonat.....	76
9.9	Ausblick .....	80
10	Literaturverzeichnis.....	81
11	Eidesstattliche Versicherung.....	94
12	Anteilerklärung an erfolgter Publikation .....	95
13	Lebenslauf .....	96
14	Publikationen und Vorträge.....	97
15	Danksagung.....	98

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Architektur des Lamellenknochens mit Osteozyten mit Havers-Kanälen – mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags (15) .....	18
Abbildung 2: Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten. RANK-L/OPG Wirkung an RANK zur Osteoklastendifferenzierung, Wirkung von Vitamin D, Parathormon und Interleukinen auf den Osteoblasten – mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags (24).....	20
Abbildung 3: Sekundäre Frakturheilung: a) Inflammationsphase; b) Reparationsphase; c) Umbauphase; d) Remodeling – mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags (42).....	23
Abbildung 4: Hemmung des Geranyl-/Mevalonatstoffwechsels im Osteoklasten durch Imidazol-Bisphosphonate – eigene Darstellung .....	26
Abbildung 5: Strukturformel Zoledronsäure mit der Imidiazolgruppe .....	29
Abbildung 6: Strukturformel Poly-(D-L)-Laktid .....	30
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Frakturmaschine nach Schmidmaier et al. mit einem Schlaggewicht von 650g bestehend aus Führungsstange und Schlaggewicht (83).....	35
Abbildung 8: Röntgenbild Rattentibiae nach Versorgung mit Titan-Kirschnerdraht als Marknagel nach 6 Wochen lateral. a: BIS, b: PDLLA, c: CTRL – Bild verändert nach (1).....	37
Abbildung 9: Versilberung nach von Kossa nach Extraktion eines unbeschichteten Marknagels aus einem sechs-Wochen-Präparat; links: distaler Abschnitt mit knöchernem Fibulaansatz; rechts: proximaler Abschnitt der Tibia .....	43
Abbildung 10: Darstellung eines sechs-Wochen-Präparates nach Methylgrün/van Gieson gefärbt; das Knorpelgewebe wird türkis gefärbt, Knochen und Bindegewebe rot. Zu sehen ist der eindeutig türkis gefärbte Frakturspalt mit knorpeligem Kallus und der noch dezent knorpelig durchgezogene knöcherne Kallus nach sechs Wochen Standzeit. ....	45
Abbildung 11: Methylgrün/van Gieson-Färbung nach Extraktion eines mit BIS und PDLLA beschichteten Marknagels aus einem sechs-Wochen-Präparat; links: distaler Abschnitt mit knöchernem Fibulaansatz; rechts: proximaler Abschnitt der Tibia .....	47
Abbildung 12: Links: Baseline = Tibiaschaftdurchmesser von der linkslateralen bis zur rechtslateralen Kortikalisaußenkante; mittig: die 1,5-fache Verlängerung der Baseline zur distalen Begrenzung der ROI; rechts: die horizontale Erweiterung der ROI auf den Kallusdiameter.....	48
Abbildung 13: Links: nach von Kossa gefärbt mit Kallusdiameter; rechts: nach Methylgrün/van Gieson mit der Topografie Kortikalis, end- und periostaler Kallus....	53

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 14: Rattentibia in Methylgrün/van Gieson gefärbt; nach Extraktion eines mit BIS beschichteten Marknagels; links: sechs Wochen nach Fraktur, rechts zwölf Wochen nach Fraktur; links sind noch deutliche Knorpelanteile im Kallus zu erkennen, rechts sind nur noch Knorpelanteile im Frakturspalt zu sehen. ....	54
Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der Kortikalisdiameter der 6-Wochen-Präparate v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	55
Abbildung 16: Kortikalisdiameter in beiden Färbungen nach 12 Wochen; links: von Kossa; rechts: Methylgrün/van Gieson gefärbt.....	56
Abbildung 17: Boxplot-Darstellung der Kortikalisdiameter der 12-Wochen-Präparate v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	57
Abbildung 18: Kallusfläche innerhalb der Region of Interest (Baseline x 1,5-fache Baseline erweitert auf Kallusdiameter) .....	58
Abbildung 19: Boxplot-Darstellung der Kallusfläche in der ROI in von-Kossa-gefärbten 6-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	59
Abbildung 20: Boxplot-Darstellung der Kallusfläche gemessen in der ROI in von-Kossa-gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	59
Abbildung 21: Histologisches Präparat der distalen Tibia nach von Kossa gefärbt nach sechs Wochen Standzeit mit Bisphosphonat.....	60
Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der prozentualen Mineralisierung in von Kossa gefärbten 6-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	61
Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der prozentualen Mineralisierung in von Kossa gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	63
Abbildung 24: Boxplot-Darstellung des prozentual Knorpelanteil in Methylgrün/van Gieson gefärbten 6-Woche-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	64
Abbildung 25: Boxplot-Darstellung des prozentualen Knorpelanteils in Methylgrün/van-Gieson gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe .....	66

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bisphosphonate und ihre relative Wirkstärke (61) .....	27
Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen für die histomorphometrische Untersuchung.....	32
Tabelle 3:Tabellarische Darstellung der Untersuchungstermine .....	36
Tabelle 4:Tabellarische Darstellung der Färberegime; links: Versilberung nach von Kossa; rechts: Methylgrün/van Gieson .....	42
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung des Safranin-O-Lichtgrün-Färberegimes .....	44
Tabelle 6: Bezeichnung nach Parfitt der von-Kossa-Färbung .....	49
Tabelle 7: Bezeichnung nach Parfitt der Methylgrün/van-Gieson-Färbung .....	49
Tabelle 8: Histologische Einteilung der sekundären Frakturheilung, (94).....	53
Tabelle 9: Median Kortikalisdiameter 6-Wochen-Präparate .....	54
Tabelle 10: Median Kortikalisdiameter 12-Wochen-Präparate .....	56
Tabelle 11: Median der prozentualen Mineralisierung der Kallusse in von-Kossa-gefärbten 6-Wochen-Präparaten .....	61
Tabelle 12: Median der prozentualen Mineralisierung der Kortikalizes in von-Kossa-gefärbten 6-Wochen-Präparaten .....	62
Tabelle 13:Median der prozentualen Mineralisierung der Kallusse in von-Kossa-gefärbten 12-Wochen-Präparaten .....	62
Tabelle 14: Median der prozentualen Mineralisierung der Kortikalizes in von Kossa gefärbten 12-Wochen-Präparaten .....	63
Tabelle 15: Median des Knorpelanteils des Kallus bei den 6-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson.....	64
Tabelle 16:Median des Knorpelanteils der Kortikalis bei den 6-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson.....	65
Tabelle 17: Median des Knorpelanteils des Kallus bei den 12-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson.....	65
Tabelle 18: Median des Knorpelanteils des Kortikalis bei den 12-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson.....	66

## 4 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AO-Klassifikation	Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
aP	alkalische Phosphatase
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Blutentnahme
BIS	Bisphosphonat-Gruppe
BMP-2	knochenmorphogenetischen Protein zwei
BP	Bisphosphonate
Ca	Kalzium
Cl	Chlorid
CRP	C-reaktives Protein
CTRL	Kontrollgruppe
DKK 1	Dickkopfprotein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gluc	Glukose
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
ICD	Internationale statistische Klassifikation
K	Kalium
KI BB	kleines Blutbild
Krea	Kreatinin
Na	Natrium
OPG	Osteoprotegerin
p. o.	per os
PDLLA	Poly-(D-L)-Laktid (-Gruppe)

PLA	Polylaktide
PLLA	Poly-(L)-Laktid
PTH	Parathormon
RANK	Receptor Activator of Nuclear factor kB
RANK-L	Ligand Receptor Activator of Nuclear factor kB
Rö	Röntgenuntersuchung
ROI	Region of Interest
s. c.	subcutan
VDR	Vitamin-D-Rezeptoren
WHO	World Health Organisation
Wnt-Signalweg	Wingless Int-1 Signalweg

## 5 Abstrakt

Einleitung:

Bisphosphonate sind wegen ihrer knochenanabolen Wirkung die Standardtherapie der manifesten Osteoporose, besonders in der Langzeittherapie. Bei der systemischen Therapie treten jedoch relevante Nebenwirkungen auf. Diese können möglicherweise durch lokale Applikation minimiert werden, deren Wirkung jedoch nicht ausreichend erforscht ist. In Vorarbeiten konnte bislang gezeigt werden, dass ein mit Zoledronsäure in PDLLA beschichteter Marknagel zu einer signifikant höheren biomechanischen Stabilität führen kann. Auch eine überlegene Implantatintegration konnte nachgewiesen werden.

Die vorliegende Dissertation soll die Frage beantworten, wie sich die lokale Anwendung des potenten Bisphosphonats (Zoledronsäure) histologisch auf die Frakturheilung auswirkt.

Material und Methoden:

Hierfür wurden in einem etablierten Frakturmodell 60 Rattentibiae standardisiert frakturiert und mit beschichtetem Titan-Kirschnerdraht versorgt. Es wurden drei unterschiedliche Beschichtungen histomorphometrisch zu zwei Standzeiten miteinander verglichen. Die Versuchsgruppe BIS (mit 50µM Zoledronsäure in einer biodegradierbaren Poly-(D,L-Laktid)-Beschichtung) gegen die beiden Vergleichsgruppen PDLLA (mit der Poly-(D,L-Laktid)-Beschichtung) und CTRL (ohne Beschichtung). Die je drei Versuchsgruppen wurden nach sechs und zwölf Wochen Standzeit untersucht. Verglichen wurden die Kallusflächen in einer definierten Gesamtfläche (Region of Interest), deren Mineralisierung und Kollagenanteil.

Ergebnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass die Präparate aller drei Gruppen nach sechs Wochen weitestgehend gleich konfiguriert waren. Nach zwölf Wochen nahmen die Kallusflächen und der mineralisierte Anteil in allen drei Gruppen im Rahmen der Umbauphase nochmals zu. In den beiden Vergleichsgruppen nahmen die Kallusflächen in der Sagittalebene nach zwölf Wochen stärker zu als in den mit Bisphosphonat beschichteten Präparaten. Die Unterschiede waren zu keiner Zeit signifikant.

Fazit:

Dass Bisphosphonate – wie aus früheren Arbeiten bekannt – zu besseren biomechanischen Eigenschaften führen, nicht aber zu histomorphometrischen Veränderungen, könnte an der unterschiedlichen Kallusformation liegen. Auch die Mikroarchitektur, die für die Belastbarkeit von Knochen grundlegend ist, spiegelt sich nicht zwingend in der Histomorphometrie wieder. Da eingesetzte Bisphosphonate die Knochenstabilität über das Remodeling hinaus auch negativ beeinflussen könnten, sollte deren Auswirkung bis zur Restitutio ad Integrum untersucht werden, um die Bisphosphonate lokal in der Therapie der Frakturheilung einzusetzen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bisphosphonate in den ersten drei Monaten der Frakturheilung keine signifikant negativen histomorphometrischen Veränderungen verursachen und somit im Rahmen eines Therapieansatzes bei entsprechender sonstiger Indikation genutzt werden können.

### **Abstract**

#### Introduction:

Bisphosphonates are the standard therapy for manifest osteoporosis due to their bone anabolic effect, especially in long-term therapy. Relevant side effects, however, occur with systemic therapy. Potentially, they could be minimized by local application, the effect of which, yet, has not been sufficiently investigated. Previously, one paper showed that an intramedullary nail coated with zoledronic acid in PDLLA can lead to significantly higher biomechanical stability. Superior implant integration has also been demonstrated. The present dissertation aimed to answer the question of how local application of the most potent bisphosphonate (zoledronic acid) histologically affects fracture healing.

#### Methods:

For this purpose, 60 rat tibiae were standardly fractured in an established fracture model and treated with coated titanium Kirschner wires. The three different coatings were histomorphometrically compared to each other at two different times– the experimental group BIS (with 50µM zoledronic acid in a biodegradable poly-(D,L-lactide) coating) against the two comparison groups PDLLA (with the poly-(D,L-lactide) coating) and CTRL (without coating). Each of the three experimental groups was examined after six and twelve weeks of service. The callus areas in a defined area (Region of Interest), their mineralization and collagen content were compared.

#### Results:

It could be shown that the preparations of all three groups had largely the same configuration after six weeks. After twelve weeks, the callus areas and the mineralized portion increased again in all three groups. This was to be expected in the remodeling phase. However, in the two comparison groups, the callus areas in the sagittal plane increased more after twelve weeks than in the bisphosphonate-coated preparations. Though the differences were not significant to any of them.

#### Conclusion:

The fact that bisphosphonates lead to better biomechanical properties – as known from previous work – but not to histomorphometric changes could be due to the

different callus formation. The microarchitecture, which is fundamental for the load-bearing capacity of bones, is furthermore not necessarily reflected in the histomorphometry. Applied bisphosphonates could also negatively influence bone stability beyond remodeling, thus their effect should be investigated up to restitutio ad integrum in order to apply bisphosphonates locally in the therapy of fracture healing.

In this work it could be shown that bisphosphonates at least do not cause significant histomorphometric changes in the first three months of fracture healing and thus can be considered as a therapeutic approach.

### 6 Einleitung

Seit Beginn der Aufzeichnungen 1873 steigt die Lebenserwartung in der Bundesrepublik Deutschland (2). Dies führt zwangsläufig zu einer Zunahme geriatrischer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang spielen auch Knochenerkrankungen eine bedeutende Rolle. Gut 40 % der aller Frakturen treten im Alter über 70 Jahren auf (3).

Ältere Patienten erleiden bei verstärkter Osteoporose und somit häufigeren pathologischen Frakturen mit Dislokationen, Gelenkbeteiligung und Trümmerbrüchen häufiger Komplikationen wie Pseudarthrosen, Wundheilungsstörungen und Lockerungen des Osteosynthesematerials, aber auch Durchgangssyndrome und Pneumonien (4; 5). Statistisch mussten 2017 in Deutschland rund 20 Millionen Frakturen in Krankenhäusern behandelt werden. Gut jede 100. Fraktur war eine Oberschenkelfraktur, von denen etwa drei Viertel mit Endoprothesen an der Hüfte versorgt werden mussten. Dabei hatten Patienten mit Oberschenkelfrakturen rund 1500 Toten im Jahr 2017 die höchste Mortalität (6). Dies belegt auch die Studie von Bliuc et al., die eine überproportional zum Alter zunehmende Mortalität nach Schenkelhalsfrakturen belegt (7).

Frakturen können sowohl konservativ mittels Ruhigstellung, als auch invasiv mit Gelenkprothesen, Implantaten und Transplantaten versorgt werden. Abhängig von der Versorgungsart treten Komplikationen auf (8). Neben dem Alter beeinflusst daher die Versorgungsart die Komplikationsrate, die Behandlungsdauer und den Heilungsverlauf von Extremitätenfrakturen am stärksten.

Die durchschnittliche Krankenhausverweildauer bei einer Oberschenkelfraktur ist mit 15 Tagen doppelt so hoch wie die der Patienten mit Schulterfrakturen, die mit 7,5 Tagen hier an zweiter Stelle stehen. Treten Frakturheilungsstörung oder anderen Komplikation auf, kommen durchschnittlich fast 20 Krankenhaustage hinzu (9).

Selbst bei nicht geriatrischen Patienten ist eine Oberschenkelhalsfraktur mit einer langen Krankenhausverweildauer verbunden. Neben der Krankenhausverweildauer betrug die durchschnittliche Arbeitsunfähigkeit der berufstätigen pflichtversicherten Patienten 2017 bei einer Oberschenkelfraktur 87 Tage; bei einer Handgelenksfraktur immerhin noch 36 Tage. Bei Frakturheilungsstörungen kamen im Schnitt nochmal gut 48 weitere Tage hinzu, bei mechanischen Komplikationen einer Gelenkprothese, eines Implantates oder Transplantates sogar gut 72 Tage.

Wäre ein lokal appliziertes Medikament geeignet, eine schnellere, suffizientere und komplikationsärmere Frakturheilung zu fördern, könnte der Patient früher mobilisiert werden. Hierdurch könnten die Krankenhausliegezeit und die Arbeitsunfähigkeitszeit (10) gesenkt werden – und vielleicht sogar die Mortalität.

## 6.1 Knochen

Das Skelettsystem dient dem Körper als Schutz- und Stützorgan und ist der Ort der Blutbildung. In dessen Aufbau kann man die Makroarchitektur der Röhrenknochen in Periost, Kortikalis, Spongiosa und Cavitas gliedern.

Beim Röhrenknochen findet in der Cavitas die Stammzellbildung statt, Kortikalis und Spongiosa dienen der Stabilität. Die Stabilität ist hierfür zum einen durch die Steifigkeit, um Lasten zu tragen, zum anderen durch die Elastizität, um bei Zug- und Scherkräften nicht zu bersten, begründet.

Das Periost ist die bindegewebige Knochenhaut, die den Knochen umgibt. Unter ihr verlaufen die äußeren Blutgefäße und Nerven, die in die Kortikalis inserieren und diese versorgen. Die Kortikalis des Knochens gewährleistet die Stabilität des Knochens und umgibt die Spongiosa, die trabekulär in den Markraum, die Cavitas, hineinragt. Spongiosa und Knochenmark werden wiederum durch eine Bindegewebshaut, vom Endost, getrennt (11).

Die Knochenmikroarchitektur wiederum setzt sich aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen zusammen. Die zellulären Bestandteile migrieren aus dem Knochenmark und differenzieren sich zu Osteoklasten und Osteoblasten. Die Osteoklasten sind phagozytierende und mehrkernige Nachfolgerzellen der Monozyten. Osteoblasten hingegen entstammen den pluripotenten mesenchymalen Stammzellen und sezernieren zum einen Kollagen Typ-I für die extrazelluläre Knochenmatrix. Sie differenzieren sich weiter zu Osteozyten, die den Knochenmetabolismus maßgeblich beeinflussen (12).

Die azellulären Anteile bestehen ihrerseits aus etwa 80 % anorganischen Bestandteilen, dem Kalziumhydroxylapatit und 20 % organischen Bestandteilen wie Kollagen Typ I (19 %) und anderen Matrixproteinen (13).

Die Kortikalisarchitektur des Lamellenknochens lässt sich in Volkmann-Kanäle, Havers-Kanäle, Osteone und Schalllamellen gliedern. In den Volkmann-Kanälen laufen die aus dem Periost in den Knochen eingesprossenen Gefäße und zweigen in die Havers-Kanäle. Um diese gliedert sich das Osteon, das aus zirkulär angeordneten

## Einleitung

Osteozyten besteht. Zwischen den Osteonen liegen die Schaltlamellen, die die Zwischenräume fest ausfüllen (14) (Abbildung 1).

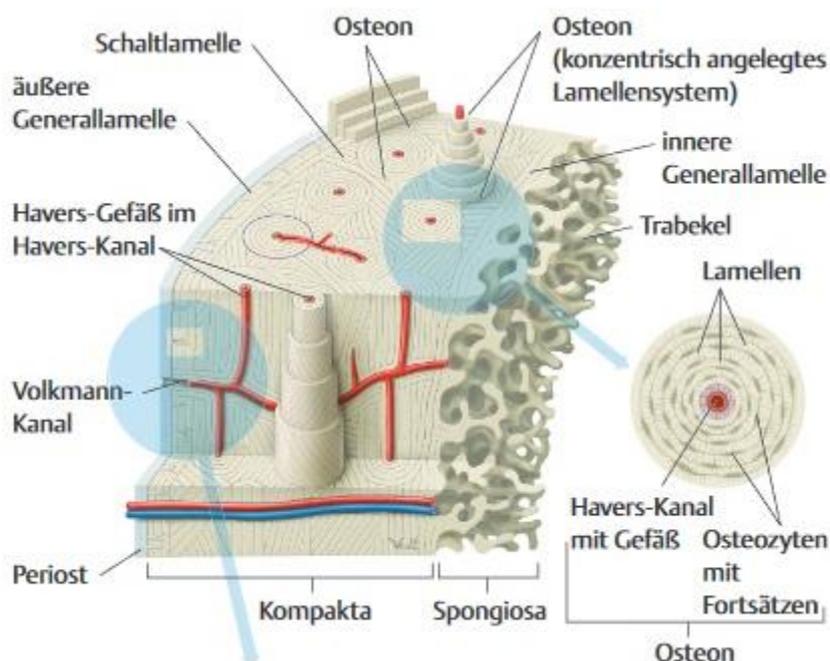


Abbildung 1: Architektur des Lamellenknochens mit Osteozyten mit Havers-Kanälen – mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags (15)

Die Osteozyten im Osteon aktivieren bei ihrer Apoptose, dem Zelluntergang, die Osteoklasten. Die Osteoklasten hydrolysieren den mineralisierten Anteil des Knochens und bilden die Howship'schen Lakunen. Durch die zunehmende Bildung von Howship'schen Lakunen verliert das Osteon seine Formstabilität und so entstehen unter dem Druck der neu gebildeten Osteone die Schaltlamellen. Das Versorgungssystem von Volkman-Kanälen, Havers-Kanälen und Howship'schen Lakunen wird als lakuno-kanalikuläres Netzwerk zusammengefasst (16).

Über Druck- und Flussveränderungen im Lakuno-Kanalikulären-System wird das Remodeling reguliert. Bei Druckabfall, wie bei einer Fraktur, nimmt der Fluss zu und die Chondrogenese wird stimuliert. Bei Druckanstieg und Flussabfall, wie durch Belastung, wird die Mineralisierung angeregt (17).

Entlang dieses Lamellengerüsts strukturiert sich wiederum die neue extrazelluläre Matrix. Hierfür sezernieren Osteoblasten das Matrixprotein Kollagen Typ I, welches die nicht mineralisierte, extrazelluläre Matrix des Knochens bildet. Entlang dieses Matrixgerüsts mineralisiert das Kalziumhydroxylapatit und bildet neuen Knochen. Durch die Mineralisierung der Matrix werden die vormals kollagenbildenden Osteoblasten eingeschlossen und reifen zu Osteozyten (18). Während der Reifung

sezernieren die Osteoblasten unter der Alkalisierung des Milieus hydrolysiertes Kalziumphosphat zur Bildung des Hydroxylapatits und der Mineralisierung (19).

Entlang dieser Matrix entstehen durch mechanische Stimulation, Druck und Mikrorisse stets neue Osteone und alte werden zu Schaltlamellen. Beim gesunden Knochen sollte die Funktion der Osteoklasten, die den Knochen demineralisieren und abbauen, und die der mesenchymalen Osteoblasten, die den Knochen mineralisieren und wiederaufbauen, im Gleichgewicht stehen. Diesen Prozess bezeichnet man als Modeling und Remodeling. Dieser Knochenumbau soll dem Alterungsprozess des Knochens entgegenwirken und den Knochen an sich stets ändernde Anforderungen anpassen, reparieren und erhalten (20).

Die Kommunikation zwischen den Osteoblasten und Osteoklasten findet über ausgeschüttete Botenstoffe statt. Diese können die jeweiligen Zellen stimulieren oder inhibieren (21).

Die Knochenhomöostase wird im Wesentlichen aufrechterhalten durch die humorale Kommunikation mit dem Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) auf den Monozyten und Osteoklasten. RANK wird von zwei kompetitiven Tumornekrosefaktoren aktiviert beziehungsweise inaktiviert. Zum einen aktiviert sein Ligand Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B (RANK-L) die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten, zum anderen inhibiert das Osteoprotegerin (OPG) (22) durch seine Bindung an RANK-L die Osteoklastogenese. Beide Tumornekrosefaktoren werden auch von Osteoblasten sezerniert. Was bedeutet, dass die Osteoblasten die Osteoklastogenese regulieren (23) (Abbildung 2).

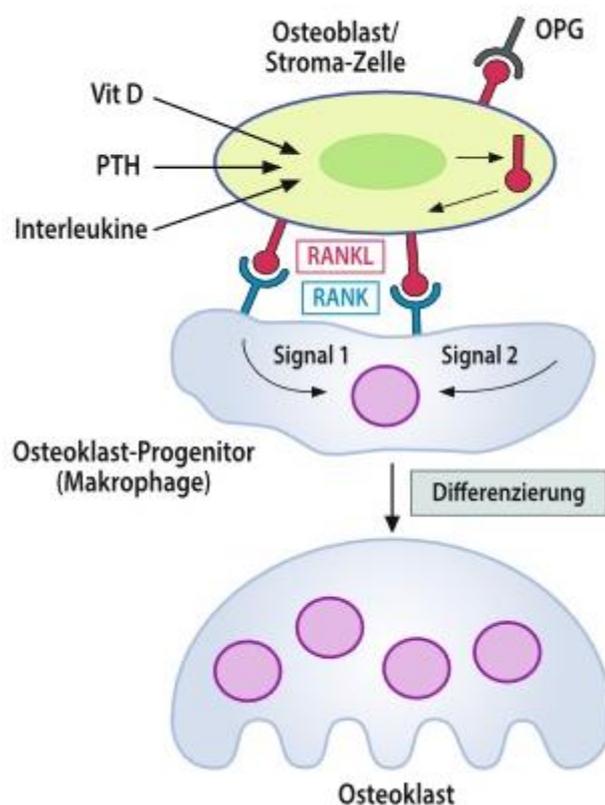


Abbildung 2: Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten. RANK-L/OPG Wirkung an RANK zur Osteoklastendifferenzierung, Wirkung von Vitamin D, Parathormon und Interleukinen auf den Osteoblasten – mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags (24)

## 6.2 Erkrankungen des Knochenstoffwechsels

Die häufigste Erkrankung des Knochenstoffwechsels ist die Osteoporose und ihr Vorläufer, die Osteopenie. Hochgerechnet waren laut der gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland 2009 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt (25). Weltweit liegt nach einem Survey der World Health Organisation (WHO) die osteoporotische Fraktur auf Platz sechs der lebensverändernden Erkrankungen (26).

Ursächlich für die Entstehung der Osteoporose ist ein gestörter Knochenstoffwechsel. Da die Knochenhomöostase komplex und multifaktoriell ist, sollen an dieser Stelle vier klinisch relevante Wege zur physiologischen Regulierung des RANK/RANK-L/OPG-Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel angesprochen werden, die zur Osteoporose führen können (27):

## **Hyperparathyreoidismus**

Das Parathormon (PTH) wird in der Nebenschilddrüse produziert. Beim Vorliegen einer Hyperkalzämie wird der Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel renal, aber auch über Knochenstoffwechsel ausgeglichen (28). Renal bewirkt eine erhöhte Parathormonausschüttung eine vermehrte Kalziumrückresorption und Phosphatausscheidung. Am Knochen stimuliert PTH am Osteoblasten die Sekretion RANK-L, welche an RANK bindet und die Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Osteoklasten lösen das gebundene Kalzium aus dem Knochen heraus, welches dadurch dann als freies Kalzium dem Körper zur Verfügung steht. Eine krankhaft vermehrte Ausschüttung des Hormons führt so zu einer Osteopenie oder zur Osteoporose (29). Das Parathormon kann auch die Synthese von Vitamin D stimulieren. Vitamin D ist ebenfalls ein Regelhormon des Kalzium-Phosphat-Stoffwechsels (30; 31) (Abbildung 2).

## **Vitamin-D-Mangel**

Vitamin D ist ein im Körper selbst aus dem Cholesterinstoffwechsel synthetisiertes Vitamin. Es ist ebenfalls ein wesentlicher Regulator des Kalzium-Phosphat-Stoffwechsels. Für Vitamin D existieren quasi ubiquitär vorkommende Vitamin-D-Rezeptoren (VDR). Bei der VDR-Aktivierung wird an den Osteoblasten die RANK-L-Präsentation erhöht und die OPG-Freisetzung vermindert. Dies führt zu einem verstärkten Einbau von Kalzium im Hydroxylapatit in die Knochenmatrix. Darüber hinaus kann Vitamin D auch die enterale Kalziumresorption steigern und so vom PTH getriggert einer Hyperkalzämie entgegenwirken (31) (Abbildung 2).

## **Östrogenmangel**

Es ist ebenso bekannt, dass Östrogene Immunzellen modulieren. T-Zellen sind neben den Osteoblasten befähigt, RANK-L zu inhibieren und so die Osteoklastenreifung zu hemmen (32; 33). Über diese Hemmung wird die Sekretion von OPG gesteigert. Zudem besitzen Osteoblasten Östrogenrezeptoren, die postmenopausal nicht ausreichend aktiviert werden (34). So führt ein Östrogenabfall zu einer Aktivitätssteigerung im Osteoklasten und einer Reduktion der Osteoblasten, und somit zu einer Demineralisierung des Knochens (Abbildung 2).

## **Morbus Cushing**

Beim Hyperkortisolismus hemmt das Überangebot an Glukokortikoiden die Osteoblastendifferenzierung (35). Darüber hinaus wird die Osteoklastenaktivierung

gesteigert und die Obliteration der intraossären Gefäße induziert, was zu einer reduzierten Knochenstabilität führt. Die Pathophysiologie ist noch nicht abschließend geklärt, aber es scheinen das Dickkopfprotein 1 (DKK 1), der Wingless Int-1 Signalweg (Wnt-Signalweg) und das Protein Sclerostin eine zentrale Rolle zu spielen (36).

### **6.3 Frakturheilung**

Eine Fraktur ist eine Diskontinuität des Knochens. Die Frakturheilung dient der Wiederherstellung der Kontinuität. Je nach Frakturausprägung erfolgt eine primäre und sekundäre Frakturheilung.

Die primäre Heilung entsteht bei direktem Kontakt der Fraktarenden. Hierbei ist die Blutversorgung der Haversschen Kanäle und des lakunären Systems bis in die Osteone maßgeblich für die Frakturheilung. Dabei „heilt“ der Knochen im Rahmen des Remodelings entlang der extrazellulären Matrix (37).

Bei verschobenen Fraktarenden und einem Frakturspalt kommt es zu Dislokationen zwischen den Haversschen Kanälen. So kann eine direkte Heilung nicht gewährleistet werden. Deswegen kommt es zur sekundären Frakturheilung. Diese wird in vier Phasen unterteilt (37; 38):

#### **Inflammationsphase**

Bei der Fraktur und der Verschiebung der Fraktarenden reißen die Blutgefäße. Hierdurch strömt Blut in den Frakturspalt und mit ihm immunmodulatorische Bestandteile wie Zytokine und Immunzellen. Im so entstandenen Hämatom wird dadurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Die migrierten Immun- und auch mesenchymalen Stammzellen organisieren das Kallushämatom. Die Immunzellen resorbieren die apoptotischen Zellen und unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren differenzieren die mesenchymalen Stammzellen zu Fibroblasten. In diesem Regenerationsgewebe kann die Gefäßsprossung beginnen (39).

#### **Reparationsphase**

Nach zwei bis drei Tagen hat sich das Hämatom organisiert. In das organisierte Hämatom im Frakturspalt wandern Monozyten, Mastzellen und Granulozyten. Die aus den Progenitorzellen differenzierten Chondroblasten und Osteoblasten bilden während dieser Phase der Kallusbildung ein Grundgerüst aus Bindegewebe und Knorpel. Dieses Grundgerüst ist die extrazelluläre Matrix des weichen Kallus (40).

## Umbauphase

Für die Kallushärtung migrieren phagozytierende Osteoklasten und kollagenbildende Osteoblasten durch die Chemotaxis in den weichen Kallus. An der Typ-I-Kollagen-Matrix der Osteoblasten beginnt die erste Mineralisierung des Kallus. Der mineralisierte Kallus besteht aus Geflechtknochen, der noch zum belastbaren Lamellenknochen umgebaut werden muss. Zur endgültigen Frakturheilung fehlt nun das oben beschriebene Modeling bzw. Remodeling des Kallus mit Wiederherstellung der ursprünglichen mechanischen Eigenschaften des Knochens innerhalb von drei bis 24 Monaten (41) (Abbildung 3).

## Remodeling

Um den aufgetriebenen, voll mineralisierten Kallus zu resorbieren, finden das Remodeling statt. Hier wird, wie im gesunden Knochen, durch die Osteoklasten der mineralisierte Kallus hydrolysiert und durch die Osteoblasten eine neue Kollagenmatrix gebildet, um eine Restitutio ad Integrum zu erreichen (41).

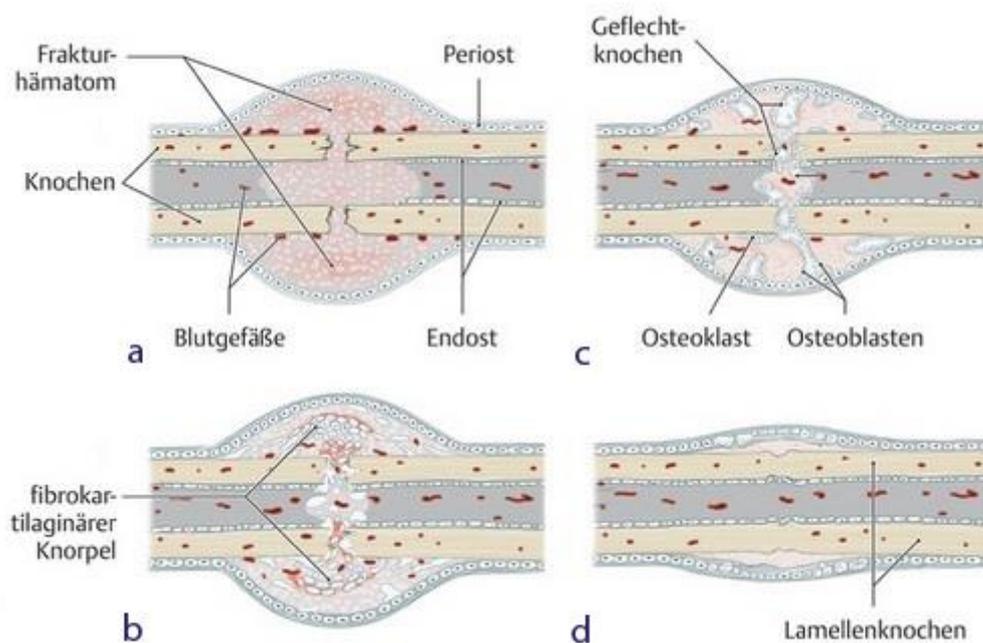


Abbildung 3: Sekundäre Frakturheilung: a) Inflammationsphase; b) Reparationsphase; c) Umbauphase; d) Remodeling – mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags (42).

### **6.4 Gestörte Frakturheilung**

Trotz aller Bemühungen für eine schnelle, komplikationsarme oder gar komplikationslose Frakturversorgung kommt es immer wieder zu Frakturheilungsstörungen und Pseudarthrosen. Bei einem radiologisch persistierenden Frakturspalt nach vier bis sechs Monaten spricht man von einer verzögerten Frakturheilung. Nach sechs Monaten von einer Pseudarthrose (43). Die Pathogenese einer Pseudarthrose ist noch nicht abschließend geklärt, aber es gibt Risikofaktoren wie Infektionen, Durchblutungsstörungen und schwere Dislokationen mit Nekrosen oder Weichteilinvasionen. Je nach Ursache spricht man von avitalen hypotrophen oder vitalen hypertrophen Pseudarthrosen. Ihnen gemeinsam ist eine schmerzhafteste Belastungsminderung des frakturierten Knochens. Auch spielen Erkrankungen des Knochenstoffwechsels eine wichtige Rolle (44; 45).

Um eine Frakturheilungsstörung zu vermeiden, sollte eine dislozierte Fraktur zeitnah osteosynthetisch versorgt werden, um eine Minderperfusion und auch eine weitere Dislokation zu vermeiden. Die osteosynthetische Versorgung erfolgt nach der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO-Klassifikation) (46) mittels einer offenen oder geschlossenen Reposition der Fraktur mit der jeweiligen Stabilisierung mittels Plattenosteosynthese oder Marknagelung, gegebenenfalls mit implementierter Gelenkendoprothese.

Nichtsdestotrotz kommt es auch mit osteosynthetischer Versorgung zu Frakturheilungsstörungen. Hierfür wird seit Jahren an Therapieaugmentationen gearbeitet, die eine schnelle und komplikationsarme Frakturheilung ermöglichen sollen. Unter anderem werden biologische Therapien entwickelt, um die Knochenheilung zu fördern. Neben der chirurgischen Sanierung bei bereits bestehenden Frakturheilungsstörungen und der systemischen Therapie besteht auch die Option einer lokalen additiven Wirkstofftherapie mit z.B. initialer Beschichtung von eingebrachtem Osteosynthesematerial mit enzymatischen Wirkstoffen oder Medikamenten, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen.

### **6.5 Bisphosphonate**

Die ersten Bisphosphonate (BP) wurden bereits im 19. Jahrhundert für industrielle Zwecke synthetisiert (47). Seit Beginn des 20. Jahrhunderts werden sie als Tenside in der Waschmittelindustrie eingesetzt und dienen zur Entkalkung von Kesseln.

Ihr Potential zur Behandlung von Krankheiten des Mineralstoffwechsels wurde erst in den 1960er Jahren entdeckt, als das Pyrophosphat im Urin und später auch im Serum nachgewiesen wurde. Im Körper können die gebundenen Phosphate nur als Pyrophosphat (P-O-P) verstoffwechselt werden. Durch den Austausch des zentralen Sauerstoffs im Pyrophosphat gegen ein Kohlenstoffatom, also P-O-P zu P-C-P, erhält man Bisphosphonate, die von den Osteoklasten nicht mehr hydrolysiert werden können.

Etidronat war eines der ersten klinisch erprobten Aminobisphosphonate, bei denen am zentralen Kohlenstoffatom noch eine Aminosäure angebunden wurde. Es wurde 1968 patentiert und gilt bis heute als Referenz für die Wirkstärke moderner Bisphosphonate (48) (Tabelle 1). Bereits bei der Anwendung von Etidronat konnte eine über die physikalisch-chemische Hemmung der Demineralisierung hinausreichende Wirkung am Knochen nachgewiesen werden. Der biochemisch-pathophysiologische Nachweis der Osteoklasteninaktivierung gelang jedoch erst in den 1980er Jahren (49). Zudem hindert Etidronat nicht nur den Knochenabbau, sondern fördert auch im hohen Maße die Remineralisierung und somit die Wiederherstellung bereits verlorener Knochensubstanz (50) (Abbildung 4).

Heutzutage sind Bisphosphonate die Standardtherapeutika gegen die manifeste Osteoporose, Knochenmetastasen und tumorinduzierte Hyperkalzämie. So konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Bisphosphonaten die Prävalenz von pathologischen Frakturen und nicht zuletzt die Mortalität bei Osteoporose senkt (51).

Bisphosphonate werden systemisch oral oder parenteral appliziert und ersetzen nach der Aufnahme das natürliche Pyrophosphat, das ein Substrat des Osteoklastenmetabolismus ist. Ihre Wirkstärke hängt von der Konfiguration des zentralen Kohlenstoffatoms ab. Wurden zunächst einfache Kohlenstoffketten angehängen, sind es bei den noch heute aktuellen Bisphosphonaten wie Pamidronat, Ibandronat und Alendronat schon Aminogruppen (52).

Die Bisphosphonate haben zwei relevante Wirkweisen, die des freien Bisphosphonats und die des im Hydroxylapatit eingebauten Bisphosphonats.

Jedoch wirken Bisphosphonate auch auf Osteoblasten. Direkt nach der Aufnahme stimuliert das freie Bisphosphonat an den mesenchymalen Stammzellen die Osteoblastendifferenzierung. Diese direkte Wirkung der Bisphosphonate ist dosisabhängig und kann sowohl zu einer Steigerung als auch bei zu hoher Dosierung zu einer Verminderung der Osteoblastenaktivität führen – bis hin zu deren Apoptose

## Einleitung

(53-57). Darüber stimulieren Bisphosphonate auch die OPG-Synthese im Osteoblasten und inhibieren die RANK-L-Freisetzung. (58). Auch hierdurch wird die Osteoklastenfunktion bereits in der Differenzierung gehemmt.

Nach der Resorption wird aber auch ein relevanter Teil der Bisphosphonate an Stelle der Pyrophosphate im Hydroxylapatit eingebaut. Bei der Knochenresorption im Rahmen des Remodeling hydrolysiert der Osteoklast das Hydroxylapatit und nimmt das Bisphosphonat auf. Das im Osteoklasten als inaktives Analogon des Adenosin-Di-/Tri-Phosphats eingeschleuste Bisphosphonat unterbricht so den Zellstoffwechsel (53). Darüber hinaus hemmt es den Mevalonatstoffwechsel des Osteoklastenmitochondriums. Dies führt zunächst zu einer Minderfunktion und schließlich zur Apoptose des Osteoklasten (53) (Abbildung 4).

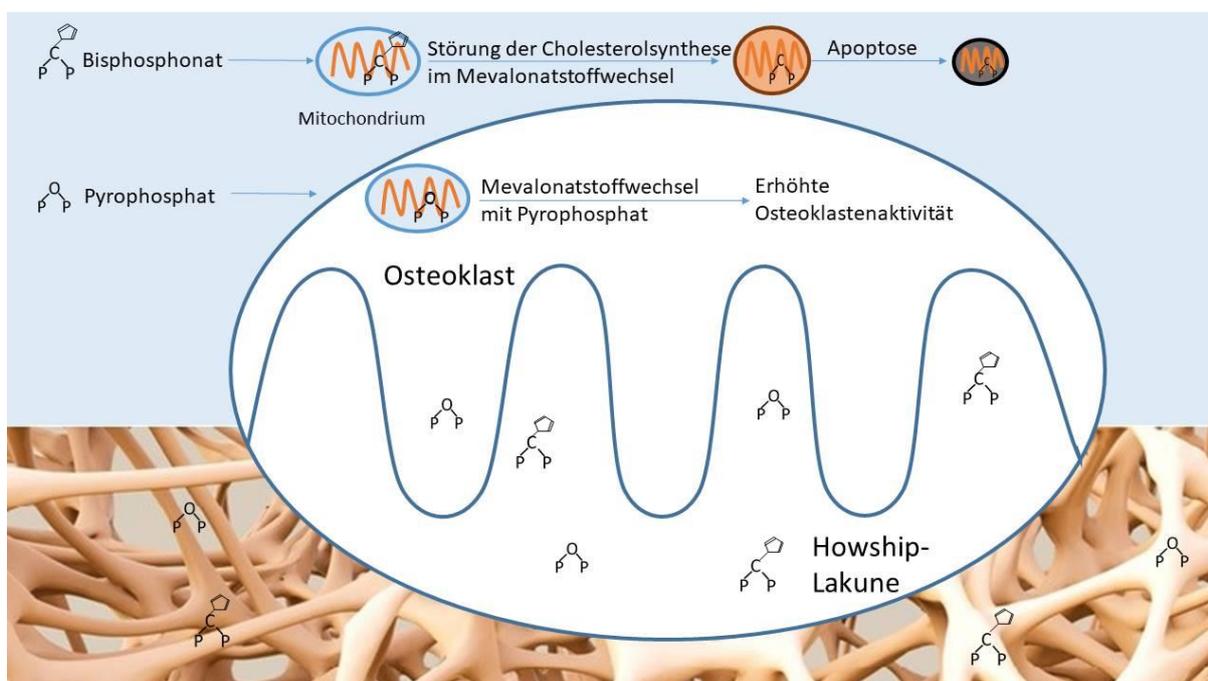


Abbildung 4: Hemmung des Geranyl-/Mevalonatstoffwechsels im Osteoklasten durch Imidazol-Bisphosphonate – eigene Darstellung

Trotz ihrer guten Wirkung bei der Therapie der Osteoporose ist die Adhärenz niedrig (59). Grund dafür sind die relevanten Nebenwirkungen des am häufigsten verwandten Bisphosphonats, dem Alendronat. Patienten können grippeähnliche Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen entwickeln. Dazu kommen noch besonders bei oraler Aufnahme (per os (p. o.)) gastrointestinale Beschwerden wie Dyspepsie, Diarrhoen, aber auch Obstipationen. (60). Zudem kann es bei der Langzeittherapie zu Nekrose des Gesichtsschädels und atypischen Femurfrakturen kommen.

Tabelle 1: Bisphosphonate und ihre relative Wirkstärke (61)

Wirkstoff	Relative Potenz	Knochenverfügbarkeit
<b>Etidronat</b>	1	1 % (p. o.); 70 % (i. v.)
<b>Pamidronat</b>	100	1 % (p. o.)
<b>Alendronat</b>	1.000	1 % (p. o.)
<b>Ibandronat</b>	10.000	1 % (p. o.); 70 % (i. v.)
<b>Risedronat</b>	20.000	1 % (p. o.)
<b>Zoledronat</b>	100.000	70 % (i. v.)

### 6.5.1 Komplikationen unter antiresorptiver Therapie

Die Therapie einer fortgeschrittenen Osteoporose beginnt mit der Einnahme von Vitamin D und Kalzium zur empfohlenen Bewegungssteigerung. Darüber hinaus wird bei der schweren Osteoporose eine begleitende antiresorptive Therapie empfohlen. Die first-Line-Therapie erfolgt mit Bisphosphonaten. Unter dieser antiresorptiven Therapie sind die atypische Fraktur und die Kiefernekrose lebensqualitätsmindernde Erkrankungen, deren Relevanz zu einer S3-Leitlinie führte (62). Die Prävalenz liegt bei 1 % - 21 % aller behandelten Patienten, was aber bei intensivierter zahnmedizinischer Betreuung nicht über die Inzidenz in der Normalbevölkerung hinauszureichen scheint (63).

Auf Grund des Bone-Targeting sammeln sich die Bisphosphonate in aktiven Knochenarealen, die zum Beispiel durch Infektionen im Kiefer entstehen. Dadurch steigt die Bisphosphonatimplementierung im Knochen, und die nun durch Osteoklasten resorbierten Howship'schen Lakunen persistieren und vergrößern sich. Durch die bereits vorhandene Infektion vermehren sich die Keime in den persistierenden Lakunen und führen zur Osteonekrose (64).

Eine bereits begonnene Kiefernekrose sollte unter langfristiger antibiotischer Abschirmung stadiengerecht chirurgisch saniert werden (62). Darüber hinaus ist eine enge zahnärztliche Anbindung erforderlich. Auch unter der Alternativtherapie der Osteoporose mit dem OPG-Biosimilar Denosumab (120 mg alle vier Wochen subcutan (s. c.)) treten Nekrosen des Gesichtsknochens auf.

Atypische Frakturen sind subtrochantäre und diaphysäre Frakturen des Femurs. Diese treten ebenfalls unter antiresorptiver Therapie auf. Die Inzidenz ist noch unklar. Nach der Task Force der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) (65) müssen alle der fünf Hauptkriterien erfüllt sein, damit von einer atypischen Fraktur gesprochen werden kann. Die Nebenkriterien sind fakultativ.

### **Kriterien der atypischen Fraktur (65)**

#### Hauptkriterien

- 1) Fraktur verläuft distal des Trochanter minor und proximal der suprakondylären Linie
- 2) Fraktur aus inadäquatem Trauma (ebenerdiger Sturz)
- 3) Fraktur verläuft transversal oder flach angeschrägt (short oblique)
- 4) Keine Trümmerfraktur
- 5) Komplette Fraktur, die durch beide Kortikalizes verläuft und gegebenenfalls eine Spitze ausbildet, inkomplette Frakturen betreffen lediglich die laterale Kortikalis

#### Nebenkriterien

- 1) Lokale periostale Reaktion der lateralen Kortikalis
- 2) Generalisierte Verdickung der diaphysären Kortikalis
- 3) Prodromi wie Leisten- oder Oberschenkelschmerzen
- 4) Bilaterale Frakturen und Symptome
- 5) Verzögerte Frakturheilung
- 6) Komorbidität wie rheumatoide Arthritis, Vitamin-D-Mangel, Hypophosphatämie
- 7) Medikamenteneinnahme wie Bisphosphonate, Glukokortikoide, Protonenpumpenhemmer

Während auch der Zusammenhang von Denosumab und atypischen Frakturen mittlerweile bewiesen werden konnte, ist die Datenlage bei den Bisphosphonaten noch sehr uneinheitlich (66). Das steht mutmaßlich im Zusammenhang mit der Therapiedauer. Mit der zunehmenden Therapiedauer von über drei Jahren erhöht sich die Inzidenz für atypische Femurfrakturen erheblich (67). Ursächlich scheint die unausgewogene Beeinträchtigung des Remodelings durch Bisphosphonate zu sein. Durch die überproportionale Hemmung der Osteoklasten und der unterlegenen Stimulation der Osteoblasten ist die Knochenmikroarchitektur weniger heterogen (68). Dies scheint zu einer signifikanten einseitigen Verdickung der lateralen Kortikalis zu führen (69). Die Kortikalisverdickung hingegen verändert die Geometrie des proximalen Femurs (70).

Ein Nebenkriterium der atypischen Fraktur ist eine verzögerte Frakturheilung (71). Auf Grund der Knochenveränderungen ist die Frakturheilung bei der bisphosphonatinduzierten atypischen Femurfraktur ebenfalls eingeschränkt. Einzig

ergeben sich aktuell Indizien, dass ein sofortiges Beenden der Bisphosphonattherapie nach dem Eintreten einer atypischen Fraktur auch der Frakturheilung zugute kommt (65).

Ein Therapiepause – „Drug-Holiday“ – nach einer Einnahmedauer von drei oder fünf Jahren wird derzeit diskutiert (65). Eine Therapieunterbrechung scheint keinen negativen Einfluss auf die Extremitätenfrakturen, aber auf pathologische Wirbelkörperfrakturen zu haben (72). Da sie aber auch nicht die Inzidenz für atypische Frakturen signifikant zu beeinflussen scheint, sollte ein Shared Decision Making bezüglich der Sturzneigung, des Frakturrisikos und der übrigen Risikofaktoren stattfinden (73).

### 6.5.2 Zoledronsäure – ein potentes Bisphosphonat

Zoledronsäure ist derzeit das potenteste Bisphosphonat, mit einer ca. 100-fach höheren Potenz zum Standardpräparat Alendronsäure (61). Zoledronat verfügt zusätzlich zur Aminoseitenkette einen Imidazolring (Abbildung 5). Die Zulassung gilt für die Behandlung der Osteoporose, der malignen Hyperkalzämie und M. Paget, sowie von Knochenmetastasen, solider Tumore und multipler Myelome in Verbindung mit einer antineoplastischen Standardtherapie.

Die unerwünschten Wirkungen sind neben den in Kapitel 6.5.1 beschriebenen atypischen Frakturen und den Osteonekrosen noch Magen-Darm-Beschwerden wie Magenulzerationen, grippeähnliche Symptome, Konjunktivitiden und Knochen- und Gliederschmerzen. Die hohe Bioverfügbarkeit durch die intravenöse (i. v.) Applikation und die hohe Potenz führen zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen, weswegen risikoärmere Applikationsformen bevorzugt werden sollten (Tabelle 1).

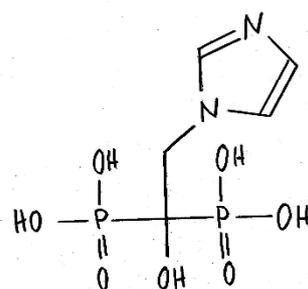


Abbildung 5: Strukturformel Zoledronsäure mit der Imidiazolgruppe

## 6.6 Applikationsform

Die Vorteile, Medikamente lokal einzubringen, liegen zum einen in der höheren Dosierung und zum anderen in der Möglichkeit der Reduzierung oder gar Vermeidung von Nebenwirkungen. Die Kombination einer mechanischen Stabilisierung mit der lokalen Wirkstofffreigabe nimmt seit Mitte der 1990er Jahre an Bedeutung zu (74). Nach einer Suche mit den Schlagworten „drug“, „device“ und „combination“ wird bei pubmed eine deutliche Zunahme der Veröffentlichungen sichtbar. Bis heute wurden fast 40.000 Beiträge und 449 systemische Reviews veröffentlicht. Für „local“, „drug“ und „delivery“ werden sogar 212.000 Veröffentlichungen und 2.400 systemische Reviews angezeigt (75). So ist die Kombination von lokal freigesetzten Bisphosphonaten zur osteosynthetischen Versorgung einer Fraktur naheliegend.

Zunächst war die lokale Applikation mittels Einbringung in den Knochen nur direkt in die angerauten Oberflächen (76) oder in Knochenzement (77) möglich. Knochenzement, ein Polymerwerkstoff, entwickelt beim Aushärten Temperaturen bis 70 °C. Später etablierten sich zumindest in der präklinischen Forschung Polylaktide aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten als Beschichtung, Membran oder als Implantat als Drug Carrier. Poly-(D-L)-Laktid (PDLLA) (Abbildung 6) hat eine hohe mechanische Belastbarkeit und kann im kalten Beschichtungsverfahren aufgebracht werden (78). PDLLA ist ein Polymer der Hydroxycarbonsäure und kann im Körper über den Zitratzyklus metabolisiert werden (79). Es ist ein etablierter Werkstoff in der Knochenchirurgie, da es hochgradig kompatibel ist und den Knochenstoffwechsel nicht beeinflusst (78).

PDLLA kann dabei auf verschiedenen Werkstoffen als Beschichtung aufgetragen werden. Hierfür wird das gelöste PDLLA in einem kalten Beschichtungsverfahren auf die Drähte aufgebracht. Wegen der besseren Anhafteseigenschaft wurden Titan-Kirschnerdrähte den Stahldrähten vorgezogen (80). In In-vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, dass über 70 % der eingebrachten Medikamente nach einem initialen Peak innerhalb der ersten 42 Tage freigesetzt werden (81; 82).

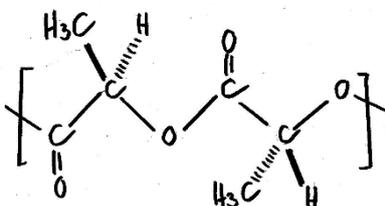


Abbildung 6: Strukturformel Poly-(D-L)-Laktid

## 6.7 Zielstellung

In einer US-amerikanischen Studie konnte belegt werden, dass bereits kleinere Frakturen durch ihre Mobilitätseinschränkung die Mortalität im Alter erhöhen (7). Umso mehr profitieren gerade ältere Patienten von einer zeitnahen belastungsstabilen Versorgung einer mobilitätseinschränkenden Fraktur. Es dauert in der Regel 12 bis 16 Wochen bis eine Fraktur belastungsstabil ist (38). Könnte die Frakturkonsolidierung verkürzt werden, könnte die frühere Mobilisierung die Komplikationsrate reduzieren. Eine zu frühe Belastung vor der Ausbildung eines ausreichend stabilisierenden Kallus erhöht jedoch auch das Risiko einer Pseudarthrosenbildung. Dadurch könnte sich wiederum die Liegedauer verlängern.

Um also eine frühere Mobilisierung zu erreichen, wird eine schnellere Frakturheilung mit Reduzierung von Komplikationen wie Pseudarthrosen oder Infektionen benötigt. Da sich die systemische Bisphosphonattherapie bei Osteoporose zur Frakturprävention bewährt hat, entstand die These, dass Bisphosphonate sich dafür eignen, durch eine lokale Applikation zu einer Steigerung der Knochenmineralisierung zu führen und sich positiv auf die Frakturheilung auszuwirken. Auf diese Weise könnten die Wirkungen der Bisphosphonate genutzt und Nebenwirkungen reduziert werden.

Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde auf das etablierte Frakturmodell von Schmidmaier et al. (83) zurückgegriffen, um eine standardisierte Schaftfraktur zu erzeugen. Nach einer Frakturheilungszeit von sechs und zwölf Wochen wurde die Kallusgröße und -zusammensetzung histomorphometrisch untersucht. Im selben Versuchsaufbau erfolgte eine radiologische und biomechanische Auswertung.

## 6.8 Die Arbeitshypothese

Lokal applizierte Zoledronsäure aus einem PDLLA-beschichteten Titan-Kirschnerdraht beschleunigt die Heilung einer Tibiaschaftfraktur der Ratte und führt zu einer stärkeren Mineralisierung und schnelleren Kallusbildung als ein unbeschichteter oder nur mit PDLLA beschichteter Marknagel.

## 7 Material und Methoden

Es wurde das etablierte Rattenmodell der Arbeitsgruppe Schmidmaier et al. verwendet (83). Hierfür wurden drei Gruppen gebildet. Dabei wurde eine mit Zoledronat in PDLLA behandelte Gruppe mit zwei Kontrollgruppen; je eine mit PDLLA und eine unbeschichtete Gruppe, verglichen. Dadurch wurden insgesamt sechs Gruppen von je zehn Ratten gebildet, die zu zwei Standzeiten untersucht wurden (Tabelle 2). Die eingesetzten Ratten wurden zufällig aus dem Käfig entnommen, auf Krankheitszeichen inspiziert und einer Versuchsgruppe zugeordnet. Im Anschluss wurden die Tiere narkotisiert und operiert.

In zweiwöchigen Abständen erfolgten Nachuntersuchungen und nach sechs bzw. zwölf Wochen die Tötung und Knochenentnahme. Zu den Untersuchungsterminen wurden die Tiere, die Zeichen von Infektionen und Schmerzen oder deutliche Fehlstellungen aufwiesen, unter dem Gesichtspunkt des Tierschutzes vorzeitig getötet.

Die verbliebenen Tiere wurden nach einer abschließenden Untersuchung eingeschläfert, um die entnommenen Knochen der biomechanischen Testung (Inhalt einer anderen Untersuchung der Arbeitsgruppe (1)) und histomorphometrischen Untersuchung zuzuführen. Zur Versuchsdurchführung mussten alle Mitarbeiter den Sachkundenachweis nach § 8 des Tierschutzgesetzes, sowie den allgemeinen Vorschriften nach § 7 des Tierschutzgesetzes zur Durchführung von Tierversuchen genügen.

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Versuchsgruppen für die histomorphometrische Untersuchung

Standzeit	Bisphosphonat/ PDLLA-Beschichtung	PDLLA-Beschichtung	Ohne Beschichtung
6 Wochen	BIS6 (n=10)	PDLLA6 (n=10)	CTRL6 (n=10)
12 Wochen	BIS12 (n=10)	PDLLA12 (n=10)	CTRL12 (n=10)

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Versuchstiere

Verwendet wurden 60 sechs Monate alte, weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 220 bis 280 Gramm. Diese Tiere entstammen der Harlan

Winkelmann Versuchstierzucht. Der Versuch wurde unter der Nummer 0177/04 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. Gehalten wurden die Tiere zu fünf in Typ-IV-Makrolonkäfigen mit hohen Käfigdeckeln in der Tierversuchseinrichtung der Charité Campus Virchow Klinikum. In dem Raum herrschten konstante 22 °C vor, und ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden wurde gewährleistet. Die Tiere hatten steten Zugang zu Futter und Wasser; die Käfige wurden mindestens wöchentlich gereinigt. Die Tiere wurden täglich von den Tierpflegern der Tierversuchseinrichtung versorgt und auch bei Bedarf medizinisch versorgt. Den Tieren wurden die Käfige mit einfachen Mitteln wie Rohren und Pappkartons in verschiedenen Formen und Größen intermittierend neugestaltet.

Nach einer zehntägigen Eingewöhnungszeit wurden die Tiere operiert. Neben der routinemäßigen täglichen Versorgung erfolgten nach zwei, vier, sechs und gegebenenfalls nach zwölf Wochen die Nachuntersuchungen. Nach sechs beziehungsweise zwölf Wochen wurden die Tiere eingeschläfert und für die Untersuchungen vorbereitet. Der histomorphometrischen Auswertung wurden 49 Tiere zugeführt.

Ausgeschlossen wurden radiologisch gesicherte mehrfragmentige Frakturen, im Verlauf dislozierte Frakturen und Implantate. Des Weiteren wurden Tiere mit systemischen und/oder lokalen Entzündungszeichen ausgenommen.

### **Materialliste**

- Sprague-Dawley-Ratten, (Fa. Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland)
- Typ-IV-Makrolonkäfige mit hohen Käfigdeckeln; (Fa. Tecniplast; Hohenpeißenberg, Deutschland)
- Rattenfutter (Fa. Sniff Ratten/Mäuse-Haltung, extrudiert, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)

### **7.1.2 Implantate und Beschichtung**

Verwandt wurden 15 cm lange, im Durchmesser 1 mm starke Titan-Kirschnerdrähte. Die Beschichtung wurde unter sterilen Bedingungen angemischt. Hierfür wurden 100 mg PDLLA in 1,5 ml Ethylacetat bei Raumtemperatur gelöst und steril gefiltert. In diese 1,5 ml Lösung wurde 1,95 mg Zoledronat gegeben. In diese Lösung wurden die

Titan-Kirschnerdrähte unter sterilen Bedingungen zweimal eingetaucht, unter Laminar Air Flow getrocknet und in steriler Verpackung versiegelt.

Bei der angewandten kalten Beschichtungstechnik ergibt sich eine Beschichtungsmasse von 1,13 mg pro Kirschnerdraht (82). In diesem Verfahren wurde die Zoledronsäure mit einem Molekulargewicht von 50  $\mu$ mol aufgetragen. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren nach einem initialen Peak aus PDLLA freigesetzt werden (84). Auch wurde die Freisetzungskinetik mit durch C14 markierter Zoledronsäure untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in den ersten Stunden 90 % des Zoledronats freigesetzt wurden, wobei der Rest über weitere 42 Tage aus der Beschichtung abgegeben wurde (85).

### Materialliste

- Titan-Kirschnerdrähte  $\varnothing$  1 mm, L 280 mm (Fa. Synthes®, Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz)
- Poly-(DL-Laktid), 30,000 Da, Resomer 203 (Fa. Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- Zometa®; (Fa. Novartis; Basel, Schweiz)

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Operatives Vorgehen

#### Anästhesie

Für die Narkose wurden die Tiere in die Narkosebox gelegt. Die Narkose wurde mit 5 Vol% Isofluran in einem 1:1 Sauerstoff/Lachsgasgemisch 0,7/0,7 l/min geführt.

Zur Analgesie und zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere aus der Box genommen und intraperitoneal (i. p.) wurde Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml (80 mg/kg KG) und Xylacinhydrochlorid 2 % (12 mg/kg KG) im Verhältnis von 1,2:0,9 ml gespritzt. Dies erfolgte gemäß des wissenschaftlichen Standards (86). Postoperativ wurde den Tieren Carprofen 4 mg/kg KG subkutan zur Analgesie gespritzt.

Für die Nachkontrollen konnten die Tiere in einer reinen Inhalationsnarkose untersucht werden. Hierfür wurde die Narkose ebenfalls in der Box eingeleitet, und mit

einer Maske über der Schnauze die Inhalationsnarkose mit 3 Vol-%-Isofluran und einem Sauerstoff/Lachgasgemisch von 0,7/0,7 l/min aufrechterhalten.

## Operationstechnik

Die narkotisierten und spontanatmenden Tiere wurden am Schwanz markiert, gewogen und für die retrobulbäre Blutentnahme punktiert. Zeitgleich wurde rektal die Temperatur gemessen. Nach der Registrierung der Tiere wurde das zu operierende rechte Bein mit der Haarschneidemaschine geschoren und zusätzlich mit der Depilationscreme maximal enthaart. Das Bein wurde mit Ethanol desinfiziert. Die Ratte mit dem bereits desinfizierten Bein wurde auf die sterile Arbeitsfläche gelegt und nun noch einmal steril abgedeckt. Der Tibiakopf wurde nun scharf freipräpariert und mit einem 1 mm starken Stahl-Kirschnerdraht aufgebohrt. Mit dem Draht wurde die Markhöhle zu etwa zwei Dritteln präpariert. Das so vorbereitete Bein wurde nun manuell in der Frakturmaschine fixiert und frakturiert (83) (Abbildung 7). Vor der Reposition wurde die Wundfläche erneut mit Ethanol eingesprüht und mit dem Titan-Kirschnerdraht stabilisiert. Nach der perioperativen Durchleuchtung wurde der Draht gekappt, die Wunde vernäht und mit Sprühpflaster bedeckt. Um eine Rotationsstabilität zu gewährleisten, wurde das Bein mit braunem medizinischem Klebeband getapt.

Die Tibiae wurden postoperativ lateral und anterior-posterior geröntgt, anschließend wurden die Tiere in einen separaten Käfig – den „Aufwachraum“ – gelegt. Die wachen Tiere kamen in den Ausgangskäfig und im Anschluss in die Tierhaltung zurück.

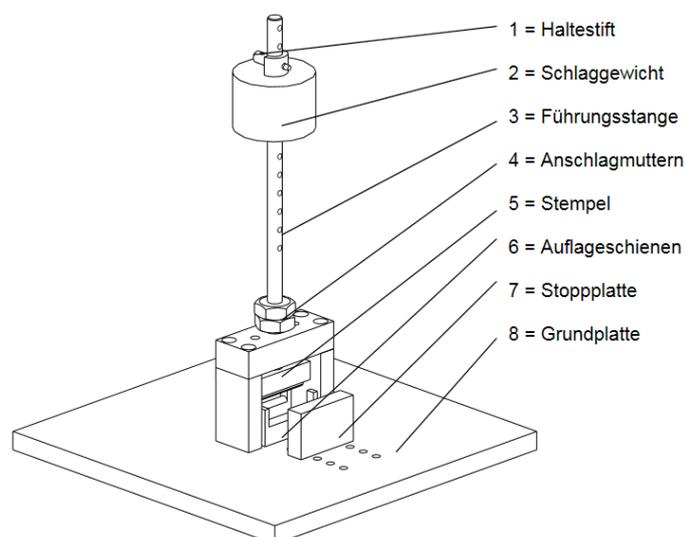


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Frakturmaschine nach Schmidmaier et al. mit einem Schlaggewicht von 650g bestehend aus Führungsstange und Schlaggewicht (83).

## Nachuntersuchungen der Tiere

### Körperliche Untersuchung

Die Tiere wurden in der Tierversuchseinrichtung routinemäßig täglich versorgt und auf Zeichen von Infektionen und anderen gesundheitlichen Alterationen inspiziert.

Darüber hinaus wurden nach der in Tabelle 3 beschriebenen Terminierung die Tiere nachuntersucht. Diese Untersuchung erfolgte ebenfalls im Operationssaal der Tierversuchseinrichtung. Für die Verlaufskontrollen genügte eine kurze Inhalationsnarkose wie in diesem Kapitel im Abschnitt „Anästhesie“ beschrieben mit einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch und Isofluran.

Die Ratten wurden bereits im Käfig inspiziert. Die Aktivität, das Fell und die Schleimhautfarbe gaben Auskunft über den Gesundheitszustand der Tiere. Schon früh waren die Stützverbände vieler Tiere abgenagt, wodurch die Wundfläche beurteilbar war. Auch die Stellung des Fußes zum Femur war bereits ein Indiz für eine ggf. zu starke Dislokation der Fraktur. Das Gewicht und die Körpertemperatur gaben zusätzliche Auskunft über die körperliche Verfassung der Tiere. Die Blutentnahme diente ebenfalls dazu, quantitative Aussagen zum Gesundheitszustand zu machen, sowie als Marker der Nierengesundheit und des Kalzium-Phosphathaushalts.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Untersuchungstermine

6-Wochen-Tiere	BE	°C	G	Rö	12-Wochen-Tiere	BE	°C	G	Rö
Operationstag	X	X	X	X	Operationstag	X	X	X	X
2 Wochen postoperativ	X	X	X	X	2 Wochen postoperativ	X	X	X	X
4 Wochen postoperativ	X	X	X	X	4 Wochen postoperativ	X	X	X	X
Explantationstag (6 Wo)	X	X	X	X	6 Wochen postoperativ	X	X	X	X
					Explantationstag (12 Wo)	X	X	X	X

BE: Blutentnahme (kl. BB, Na+, K+, Cl-, Ca++, Gluc., Krea., aP, CRP); °C: Körpertemperatur;  
G: Gewicht; Rö: Röntgenuntersuchung

### Radiologische Untersuchung

Die Röntgenuntersuchung erfolgte postoperativ, bei den Nachkontrollen und vor der Tötung. Der Abstand der Tiere zum Sender des Röntgengerätes betrug 60 cm, dies wurde bei jeder Aufnahme neu kontrolliert, um einen festen Maßstab zu erreichen. Die Tiere lagen hierbei direkt auf den digitalen Röntgenplatten. Mit Bleizeichen wurden die Tiernummer sowie die Körperseite und Ausrichtung dokumentiert. Das Bild wurde bei einer Strahlenhärte von 55 kV und einer Belichtungszeit von 1,8 mAs erzeugt

(Abbildung 8). Die Röntgenplatten wurden in der Radiologie des Virchowklinikums entwickelt.



Abbildung 8: Röntgenbild Rattentibiae nach Versorgung mit Titan-Kirschnerdraht als Marknagel nach 6 Wochen lateral. a: BIS, b: PDLLA, c: CTRL – Bild verändert nach (1)

### Laborchemische Untersuchung

Die Gesellschaft für Versuchstierkunde empfiehlt für Blutentnahmen eine Maximalmenge von weniger als 10 % des Gesamtblutvolumens. Bei Ratten liegt das Gesamtblutvolumen bei 15 bis 20 ml, was ca. 7 % des Körpergewichts bei Tieren von 220 – 280 g entspricht. Deshalb wurde den Tieren im medialen Lidwinkel retrobulbär weniger als 1,5 ml Blut mit heparinisierten Kapillaren entnommen, wovon jeweils 200 µl in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und in ein Serum-Röhrchen gegeben wurden.

Im EDTA wurde das kleine Blutbild inklusive Hämoglobin und Leukozyten bestimmt. Das Serum wurde quantitativ auf Natrium, Kalium, Chlorid, Kreatinin, Glucose, C-reaktives Protein sowie Kalzium und die alkalische Phosphatase als Marker des Knochenstoffwechsels getestet.

### **Tötung und Knochenentnahme**

Am Ende der Standzeit wurden die Tiere gemäß den Verlaufskontrollen untersucht. Nach Abschluss der Maßnahmen wurden die noch immer narkotisierten Tiere mit

etwa 1 ml 7,46%iger Kaliumchloridlösung intrakardial getötet. Nach Sicherstellung des Todes durch Fühlen des Herzschlages wurden den Tieren die Beine vom Hüftgelenk abwärts chirurgisch entfernt. Das Bein wurde mit Hilfe von Pinzette, Schere und Skalpell von den Muskeln und Sehnen befreit und die Tibia vom Knie und oberen Sprunggelenk exartikuliert. Hierbei wurde sehr auf die Unversehrtheit des Periosts geachtet. Die Marknägel wurden aus den Tibiae mit Hilfe einer kleinen Hohlmeißelzange nach Luer manuell extrahiert.

Für die Histomorphometrie wurden die Tibiae zunächst distal direkt über den Kondylen mit dem Skalpell gekürzt und in 10%ige, gepufferte Formaldehydlösung eingelegt. Dieses Vorgehen ermöglicht ein schnelles und sicheres Durchdringen des Knochens mit Formaldehyd.

### **Materialliste**

#### Medikamente

- 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether (Isofluran), Forene® (Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- Ketaminhydrochlorid, Ursotamin® (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland)
- Xylacinhydrochlorid, Rompun® 2 % (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
- Caprofen, Rimadyl® 2ml (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland)

#### Verbrauchsmaterial

- Kanülen, steril, 24G (BD Microlance™ 3, BD Drogheda, Irland)
- Enthaarungscreme Pilca® (Thioglycolsäure, Fa. Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Sterile Einmalhandschuhe (Gammex® PF; Ansell (UK) Ltd, Tamworth, Staffordshire, UK)
- OP-Gesichtsmaske (Farstar® GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Ethanol 100 %, Softasept® N (Fa. B/Braun, Melsungen, Deutschland)
- Sterile Tupfer, 20 x 20 cm, Gr. 3 (Maimed, Neuenkirchen, Deutschland)
- Steriles OP-Tuch (Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)
- Sprühpflaster Band-Aid™ (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Braunes Pflaster: Leukoplast® (Fa. Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)

- Unsterile Saugtücher, Krankenunterlage 60 x 90 cm
- Einmalspritzen 1 ml (BD Plastipak™, Becton Dickinson SA, Madrid, Spanien)

### Steriles OP-Besteck

- Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan)
- Hautfäden: Prolene® 5-0, blau, nicht resorbierbares Nahtmaterial (Fa. Ethicon® INC, Somerville, New Jersey, USA)
- Zange
- Schere
- Nadelhalter
- Hohlmeißelzange nach Luer
- Pinzette
- Intramedullärer „Nagel“, Titan-Kirschnerdraht, ø 1 mm, L 280 mm (Fa. Synthes®, Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz) unbeschichtet oder PDLLA- oder PDLLA+ZOL-beschichtet
- 1,0 mm Kirschnerdraht aus Stahl
- 0,8 mm Kirschnerdraht aus Stahl

### **Geräte**

- Narkosegerät Artec Typ Vet, Nr. 10495186 (Stephan GmbH Medizintechnik, 56412 Gackebach, Deutschland)
- Narkosebox mit Schlauchsystem und Inhalationsmaske
- Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aeskulap AG&Co KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Röntgen-Bogen, Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Deutschland)
- Waage Typ TE6100 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Frakturmaschine

## **7.2.2 Histologische Aufarbeitung**

### **Fixierung**

Die Fixierung erfolgte in 10%iger gepufferter Formaldehydlösung. Diese wurde aus 324 ml 30%iger Formaldehydlösung, 550 ml 100%igem Alkohol, 130 ml Barbitol-Na-Puffer und 6 g Glucose zusammengefügt. In dieser Lösung wurden die Präparate, die

zuvor in mit Bleistift markierte Plastikkassetten gelegt wurden, für drei Tage im geschlossenen Glas eingelegt, um die Verdampfung zu minimieren. Für eine gleichmäßige Verteilung standen die Gläser bei 25 °C auf einem Schüttler. Durch das Formaldehyd wurden die Proteine soweit verkettet, dass die Strukturen während des weiteren Procedere stabil blieben.

### **Entwässerung**

Da der Methylmethacrylat-Kunststoff (PMMA) nicht wasserlöslich ist, mussten die Präparate erst entwässert und mit einem Lösungsmittel infiltriert werden, damit der Kunststoff tief eindringen konnte. Dafür wurden die Präparate zehn Minuten unter Leitungswasser gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Hierbei wurde das Gewebe jeweils drei Tage lang in 70-, 80-, 96- und dreimal in 100%igem Alkohol infiltriert. Im Anschluss wurden die Präparate mit Xylol infiltriert. Xylol ist ein Lösungsmittel, welches Alkohol und Kunststoffe vermitteln kann.

Zunächst musste gewährleistet werden, dass die Präparate vom dickflüssigen Kunststoff durchdrungen werden konnten. Hierfür wurde der Knochen zunächst aus dem Xylol in einer weniger konzentrierten und somit flüssigeren Mischung des Kunststoffes Technovit 9100 soweit durchtränkt, dass die zunehmend konzentriertere und dickflüssigere Kunststoffmasse besser eindringen konnte.

So wurden nach Herstellerangaben die Präinfiltrations- und Infiltrationslösung hergestellt. In der Präinfiltrationslösung lagen die Knochen für einen Tag bei 25 °C auf dem Schüttler, für die Infiltration wurden die Knochen mindestens eine Stunde lang bei 4 °C in einem Laborkühlschrank gelagert (87).

### **Einbetten**

Nach Abschluss der Infiltration wurde der Technovit-9100-Kunststoff zum Einbetten ebenfalls nach Anleitung angemischt. Die Mehrkomponentenlösung wurde auf die bereits in die verschließbaren Formen hineingelegten Tibiae gegossen. Hierbei lagen die Knochen auf der antero-medialen Fläche. Die verschlossenen Kunststoffformen wurden in Kunststofftaschen gelegt und auf Eis gelagert, um die für das Aushärten erforderliche Temperatur von unter -4 °C zu gewährleisten. Nach 48 Stunden wurden die Präparate aus den Formen genommen und mit einem Handschleifgerät zurechtgeschliffen. Hierfür mussten die Seitenkanten parallel zu einander liegen, um die entstandenen Plastikblöcke im Mikrotom sicher einspannen zu können. Darüber

hinaus wurden die Blöcke mit einem weiteren Mehrkomponenten-Kunststoff Technovit 3040 soweit erhöht, dass das Präparat eine Gesamthöhe von 3-4 cm erreichte (88).

### **Schneiden**

Die Blöcke wurden in das Schlittenmikrotom eingespannt und von ihnen 7 µm feine Schnitte erstellt. Hierfür wurde das Messer mit einem Anstellwinkel von 5-6° eingesetzt und der Block mit einer Wasserwaage ausgerichtet. Mittels Mikrotom wurden mit Hilfe von Schneidflüssigkeit nach Möglichkeit zehn Schnitte angefertigt. Diese wurden auf mit 70%igem Alkohol benetzte Objektträger gelegt, welche durch Kisolfolie geschützt mit Filterpapier abgedeckt und gestapelt wurden. Die Stapel wurden in eine Presse eingespannt und für zwei Tage bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert.

Auf diese Weise wurden pro Präparat zehn Schnitte inklusive Sicherungsschnitte erstellt. Diese wurden im Objektkasten verwahrt und nur zur Färbung entnommen.

### **Färbungsvorbereitung**

Für die Darstellung des mineralisierten Knochens und des Knorpelgewebes mit hohem Kollagenanteil wurden die Präparate nach von Kossa und Methylgrün/van Gieson gefärbt. Für alle Färbungen mussten die Präparate von Filterpapier und Kisolfolie befreit und in Schiffchen gelegt werden. Anschließend wurden die Objektträger je zweimal für 30 Minuten in Methoxy-Ethyl-Acetat-Lösung getaucht und somit vom Technovit-Kunststoff befreit. Danach wurden sie je zwei Minuten in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 % und 70 %) und abschließend in Aqua dest. gelegt, um sie für die wasserlöslichen Farbstoffe zugänglich zu machen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Färberegime; links: Versilberung nach von Kossa; rechts: Methylgrün/van Gieson

Versilberung nach von Kossa	Zeit in Min	Methylgrün/van Gieson	Zeit in Min
Präparate entplasten mit MEA	3x20	Präparate entplasten mit MEA	3x20
Absteigende Alkoholreihe (100, 96, 80, 70 %)	Je 2	Absteigende Alkoholreihe (100, 96, 80, 70 %)	Je 2
Aqua dest.	2	Aqua dest.	Kurz
3% Silbernitratlösung	5	Methylgrün	40
Aqua dest.	3xkurz		
Natrium-Formaldehyd-Lösung	2		
Leitungswasser	10		
5%ige Natriumthiosulfat-Lösung	5	Aqua dest.	Kurz
Leitungswasser	10	70 % EtOH	2
Aqua dest.	Kurz	van Gieson	2
Aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %)	Je 2	Aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %)	Je 2
Xylol	2x5	Xylol	2x5
Eindeckeln mit Vitroclud		Eindeckeln mit Vitroclud	

### Versilberung nach von Kossa

Bei der Versilberung nach von Kossa werden die Hydroxylapatitanteile des Knochens versilbert und schwarz dargestellt. Sie dient der Darstellung mineralisierter Knochenanteile.

Für die Versilberung nach von Kossa wurden die entplasteten und rehydrierten Präparate fünf Minuten lang in Silbernitrat getaucht, mit Aqua dest. dreimal gespült und in Natrium-Formaldehydlösung reduziert. Die Schnitte wurden unter fließendem Leitungswasser gespült und in Natriumthiosulfat entwickelt. Im Anschluss wurden die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe und Behandlung mit Xylol auf das anschließende Verdeckeln vorbereitet (Abbildung 9).

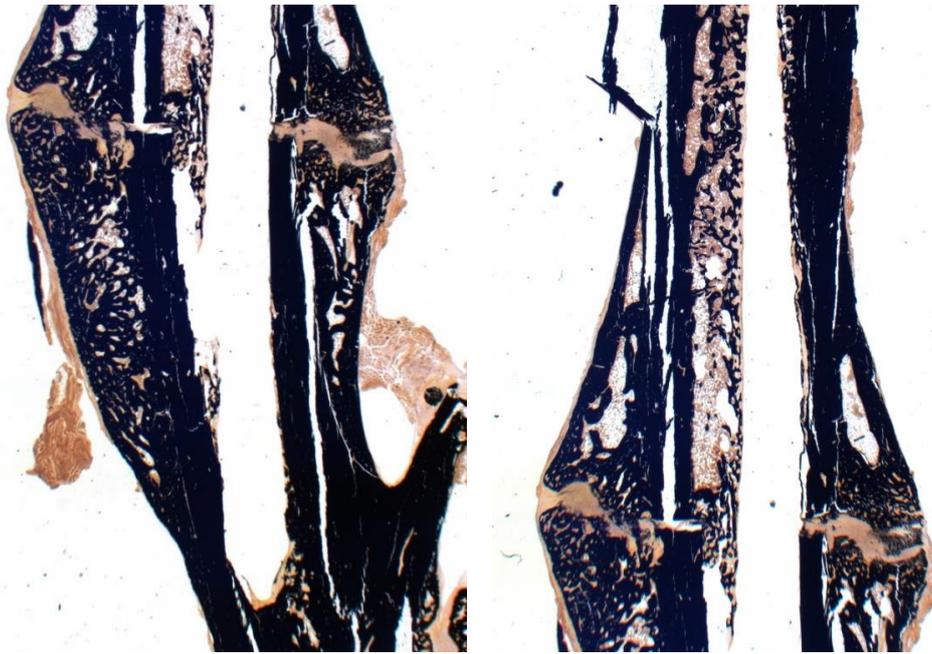


Abbildung 9: Versilberung nach von Kossa nach Extraktion eines unbeschichteten Marknagels aus einem sechs-Wochen-Präparat; links: distaler Abschnitt mit knöchernem Fibulaansatz; rechts: proximaler Abschnitt der Tibia

### **Färbung nach Safranin-O/Lichtgrün und Methylgrün/van Gieson**

Nach dem Schneiden der Präparate wurden diese initial nach Safranin-O/Lichtgrün (Tabelle 5) gefärbt. Bei der Safranin-O/Lichtgrün-Färbung wurden die Präparate vermutlich aufgrund einer neuen Rezeptur mehrheitlich beschädigt. Da diese Färbung nicht ausgewertet werden konnte, wird an dieser Stelle nicht weiter auf die Färbung selbst, sondern auf die Problemlösung eingegangen.

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung des Safranin-O-Lichtgrün-Färberegimes

Safranin-O/Lichtgrün-Färbung	Zeit in Min
Präparate entplasten mit MEA	3x20
Absteigende Alkoholreihe (100, 96, 80,70 %)	Je 2
Aqua dest.	2
0,015% Safranin-O-Lösung	0,5
Aqua dest. I	3xkurz
Aqua dest. II	3xkurz
Aqua dest. III	3xkurz
0,02%ige Lichtgrünlösung	1
1%ige Essigsäure	6xkurz
Aqua dest.	6xKurz
96%iger Alkohol	8xkurz
100%iger Alkohol I	8xkurz
100%iger Alkohol II	8xkurz
Xylol	2x5
Eindeckeln mit Vitroclud	

Nach einigen frustrierten Versuchen, die destruierende Lösung durch Erneuerung der Färbelösung und Pufferung und erneuter Färbung zu korrigieren, musste eine neue Färbung etabliert werden. Hierfür wurde die Methylgrün/van-Gieson-Färbung gewählt. Die Safranin-O/Lichtgrün-Färbung dient der Knorpeldarstellung. Hierbei wird der Knorpel rot dargestellt und knorpelfreies Gewebe türkis. Die kationischen Farbstoffe mit den anionischen Mucopolysacchariden werden rot gefärbt (89). Zur besseren Abgrenzung des Knochens und anderer Gewebe wird mit Lichtgrün gegengefärbt (90).

Die Methylgrün/van-Gieson-Färbung dient der Knorpeldarstellung. Hier wird jedoch das Kollagen rot (pink) gefärbt. Bei der Gegenfärbung mit Methylgrün werden die Zellkerne blau dargestellt. Daraus ergibt sich bei der Methylgrün/van-Gieson-Färbung eine türkise Darstellung des Knorpels, wohingegen sich das Bindegewebe und der Knochen rot (pink) einfärben (Abbildung 10).

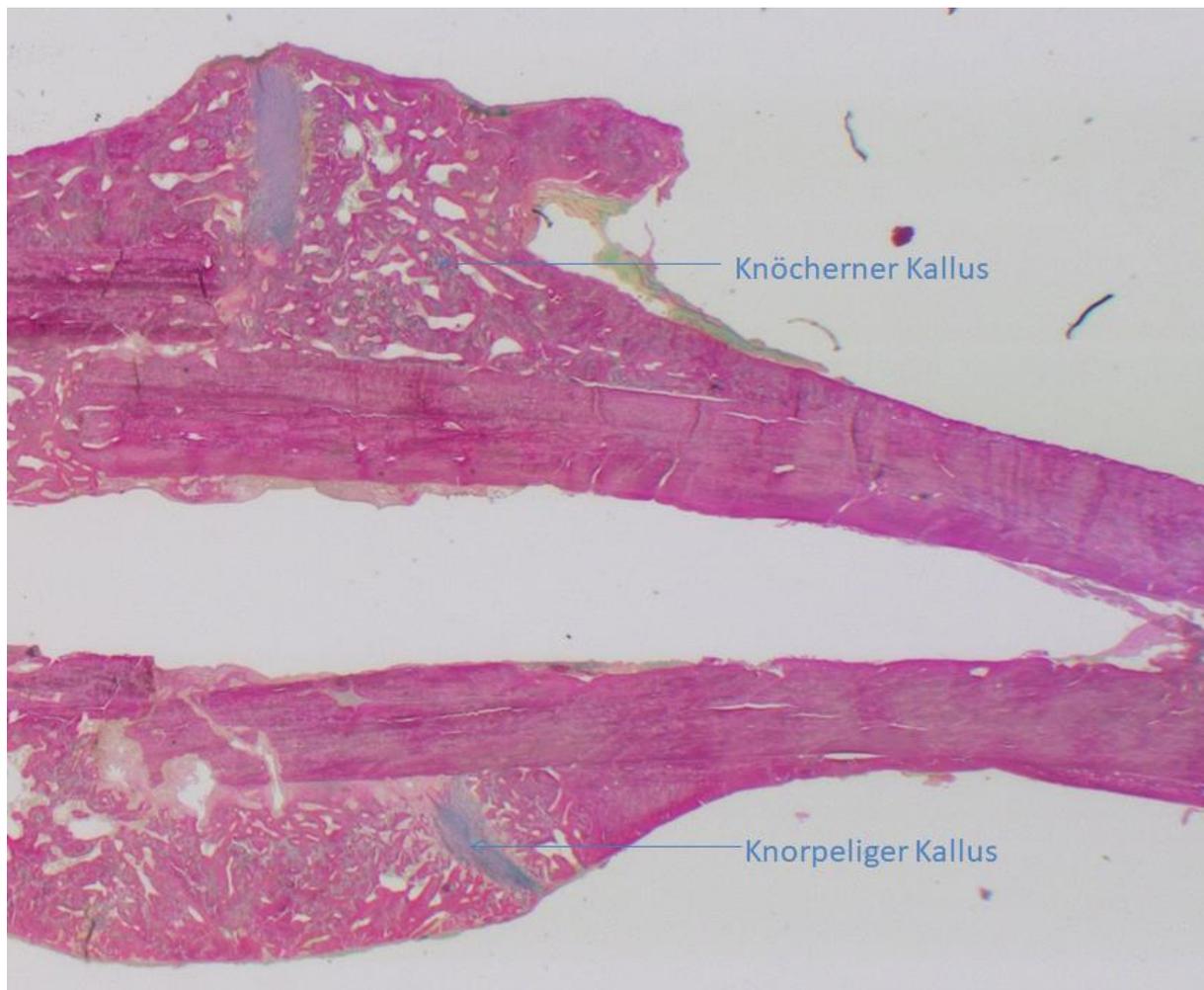


Abbildung 10: Darstellung eines sechs-Wochen-Präparates nach Methylgrün/van Gieson gefärbt; das Knorpelgewebe wird türkis gefärbt, Knochen und Bindegewebe rot. Zu sehen ist der eindeutig türkis gefärbte Frakturspalt mit knorpeligem Kallus und der noch dezent knorpelig durchzogene knöcherner Kallus nach sechs Wochen Standzeit.

Für die Färbung nach Methylgrün/van Gieson wurden die entplasteten und entwässerten Präparate mit Aqua dest. gespült, 40 Minuten lang in Methylgrün getaucht und die Zellkerne blaugrün gefärbt. Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. erfolgte das zweiminütige Lösen in 70%igem Ethanol und das zweiminütige Gegenfärben in van-Gieson-Lösung zur Diskriminierung von Bindegewebe (hellrot) und Knorpel (dunkelrot). Im Anschluss wurden die Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol auf das Verdeckeln vorbereitet (Tabelle 4).

## Material

- Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette (Sakura Inc., Torrance, USA)
- Fixierlösung (10 % normalgepuffertes Formaldehyd)
- Alkohol, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- Xylol (J. T. Baker, Deventer, Niederlande)

- Petrolbenzin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Kunststoff Technovit 9100 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Kunststoff Technovit 7200 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Fixationskleber Technovit 7230 (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Technovit 4000, 3-Komponentenkleber (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Technovit 3040, 2-Komponenten-Kunststoff (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Einmalskalpell No.15 (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Kunststoffobjektträger (Walter Messner GmbH, Oststeinbeck, Deutschland)
- Deckgläser (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Objektträger (Superfrost Objektträger, 76x26 mm ISO-Norm 8037, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerke GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland)
- Methoxy-Ethyl-Acetat-Lösung (Art.-Nr. 8.06061.2500 Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland)
- Schneideflüssigkeit (Fa. WIV, Schwetzingen, Deutschland)

## Geräte

- Miniaturtrennsäge (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Schüttler, HS 501 digital (IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland)
- Licht-Polymerisationsgerät (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Brutschrank 37 °C (Heräus Kulzer, Hanau, Deutschland)
- Bandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Schleifmaschine (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Mikro-Schleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland)
- Digitales Mikrometer-Feinmessgerät (Mitutoyo America Corporation, Aurora, USA)
- Handschleifgerät (Phoenix 3000, Jean Wirtz, Bestellung über Metec, Laborgeräte Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Schlittenmikrotom (SM 2500S, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Messer (Hartmetall, Schliff 16 cm, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Wärmeschrank (Functionline, Heraeus Instruments, Typ: B12, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)

## 7.2.3 Histomorphometrie

### Histomorphometrische Auswertung

Die fertiggestellten Präparate wurden mithilfe eines mit einer Digitalkamera versehenen Lichtmikroskopes aufgenommen. Die Bilder wurden bei der Aufnahme mit einem Maßstab versehen. Dieser wurde in einer Extensible-Markup-Language-(XML)-Datei dem Bild zugeordnet und gespeichert. Anhand der in der XML-Datei gespeicherten digitalen Daten des Bildes konnte das Bildbearbeitungsprogramm die Flächen maßstabsgetreu berechnen. Festgelegt wurde, dass sich proximal immer am oberen Bildrand und distal immer am unteren Bildrand befand (Abbildung 11). Jedes Präparat wurde so ausgerichtet, dass ventral nach links und dorsal nach rechts im Bild zeigte.

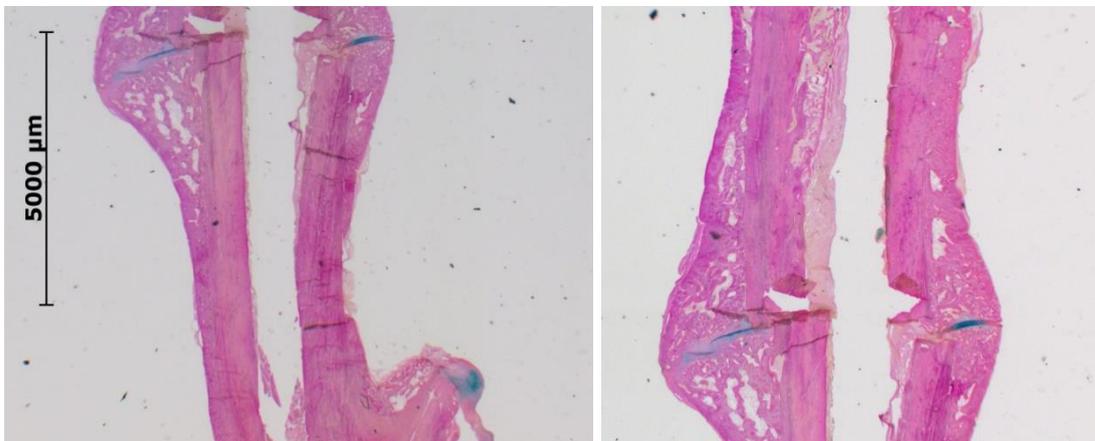


Abbildung 11: Methylgrün/van Gieson-Färbung nach Extraktion eines mit BIS und PDLLA beschichteten Marknagels aus einem sechs-Wochen-Präparat; links: distaler Abschnitt mit knöchernem Fibulaansatz; rechts: proximaler Abschnitt der Tibia

Die Bilder wurden wegen des Präparatformaten in je einen distalen und proximalen Abschnitt geteilt. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit der Software KS400, die anhand festgelegter Pixelfärbungen Flächen berechnen kann (Abbildung 11).

Zunächst wurde die Region of Interest (ROI) festgelegt. Diese berechnete sich aus der Strecke zwischen den ventralen und dorsalen Kortikalisaußenkanten (dem ursprünglichen Tibiadurchmesser). Diese im folgenden Baseline genannte Länge wurde nun in 1,5-facher Ausdehnung jeweils nach distal und proximal ausgeweitet. Zuletzt wurde die Fläche auf den gesamten Kallusdiameter ausgeweitet. (Abbildung 12).

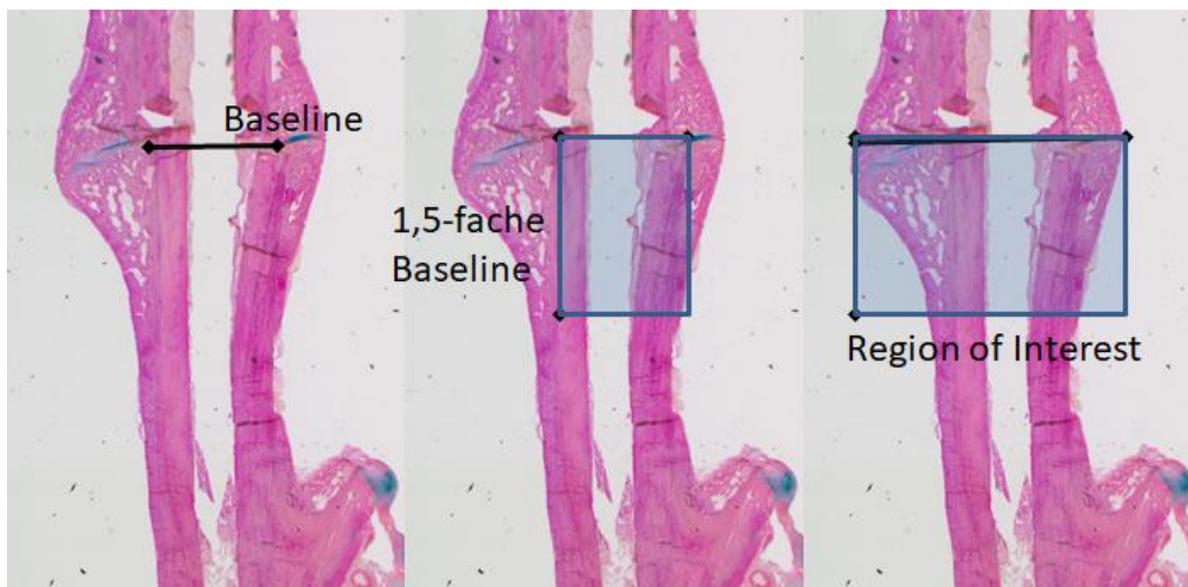


Abbildung 12: Links: Baseline = Tibiaschaftdurchmesser von der linkslateralen bis zur rechtslateralen Kortikalisaußenkante; mittig: die 1,5-fache Verlängerung der Baseline zur distalen Begrenzung der ROI; rechts: die horizontale Erweiterung der ROI auf den Kallusdiameter

Nachdem die ROI markiert wurden, mussten die jeweiligen Flächen markiert werden: endostaler Kallus, Kortikalis und periostaler Kallus. Aufgrund der histologischen Unterschiede konnte die Kortikalis sicher von dem endostalen und periostalen Kallus unterschieden werden. Diese Flächengrenzen wurden manuell in dem Programm eingezeichnet. Hierfür konnte beliebig gezoomt werden.

Nun wurden manuell die Farbnuancen der knorpeligen Anteile in der Methylgrün/van-Gieson-Färbung und die mineralisierten Anteile in der von-Kossa-Versilberung festgelegt. Diese Festlegung wurde erneut händisch auf ihre Richtigkeit kontrolliert. Anhand der Färbung konnten die jeweiligen Strukturen – Knochen, Bindegewebe oder freie Fläche – zugeordnet werden.

Nach Beendigung der Farbfestlegung berechnete das Programm die Größe der gefärbten Flächen. Als Ergebnis erhielt man eine Quadratmillimeterangabe der mineralisierten, knorpeligen und der bindegewebigen Flächen. Das Procedere wurde zur besseren Validität komplett mindestens dreimal wiederholt.

Die Einteilung der Flächen und deren Nomenklatur erfolgte nach der Standardisierung von Parfitt et al. (91). Es ergaben sich Flächenangaben zum jeweils linken und rechten periostalen Kallus, der linken Kortikalis, dem linken endostalen Kallus, dem rechten endostalen Kallus, der rechten Kortikalis und dem rechten periostalen Kallus, sowie deren prozentuale Färbung im Sinne einer Mineralisierung oder eines knorpeligen Anteils.

## Bezeichnungen nach Parfitt

Die ermittelten Flächen wurden nach der von der ASBMR vorgegebenen Nomenklatur nach Parfitt bezeichnet. Bestimmt wurde in der von-Kossa-Färbung der mineralisierte und somit versilberte Anteil und der nicht mineralisierte Anteil (Tabelle 6), in der Methylgrün/van Gieson Färbung die Zellen mit hohem Kollagenanteil, also das Knorpelgewebe (Tabelle 7).

Tabelle 6: Bezeichnung nach Parfitt der von-Kossa-Färbung

Baseline/[mm]	Tibiadurchmesser (Festlegung von Untersucher)
ROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche der Region of Interest
PsCIROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche periostaler Kallus
PsCITAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gewebefläche periostaler Kallus
PsCIBAr/[mm <sup>2</sup> ]	Knochenfläche periostaler Kallus
CtROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche Kortikalis
CtTAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gewebefläche Kortikalis
CtBAr/[mm <sup>2</sup> ]	Knochenfläche Kortikalis
EsCIROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Linker endostaler Kallus Fläche
EsCITAr/[mm <sup>2</sup> ]	Linker endostaler Kallus Gewebefläche
EsCIBAr/[mm <sup>2</sup> ]	Linker endostaler Kallus Knochenfläche

Tabelle 7: Bezeichnung nach Parfitt der Methylgrün/van-Gieson-Färbung

Baseline/[mm]	Tibiadurchmesser (Festlegung von Untersucher)
ROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche in der Region of Interest
CtROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche Kortikalis
PsCIROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche periostaler Kallus
EsCIROIAr/[mm <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche endostaler Kallus
PsCICollAr/[mm <sup>2</sup> ]	Knorpelfläche periostaler Kallus
EsCICollAr/[mm <sup>2</sup> ]	Knorpelfläche endostaler Kallus

## Geräte

- Digitalkamera (Sony 3CCD Color Video Camera, AVT Horn, MC 3254; Tokio, Japan)
- Lichtmikroskop (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)

### Software

- Axio-Vision 4.0 (Fa. Carl-Zeiss, Jena, Deutschland)
- KS 400 (Fa. Carl-Zeiss, Jena, Deutschland)
- Microsoft Excel 2010 (Fa. Microsoft; Redmond/USA)

### 7.3 Statistik

Für die statistische Aufarbeitung wurde Excel zur Datenbearbeitung und -speicherung und SPSS Statistics 27 für die statistische Auswertung und Erstellung der Diagramme genutzt. Mit GPower wurde die Effektstärke und Gruppengröße sowie die dazugehörige Power mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Hierfür wurden zwei der drei Gruppen statistisch miteinander verglichen und dabei eine Effektstärke und eine Gruppengröße mit dazugehöriger statistischer Power berechnet.

Die drei unabhängigen Gruppen nicht normalverteilter Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,05$  auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Beim Kruskal-Wallis-Test wurden die Ergebnisse vom kleinsten Rang aufwärts sortiert und die Rangvarianz bestimmt.

### Software

- SPSS Version 27 (Fa. IBM, Armonk/USA)
- GPower 3.1 (Franz Paul, Kiel/Germany)
- Microsoft Excel 2010 (Fa. Microsoft; Redmond/USA)

## 8 Ergebnisse

Zielstellung war die histomorphometrische Evaluation der Kallusgröße und Mineralisierung nach der Behandlung mit lokal applizierten Bisphosphonaten aus einer PDLLA Beschichtung (BIS) im Vergleich zu einer reinen PDLLA Beschichtung (PDLLA) und unbeschichteten (CTRL) Titan-Kirschnerdrähten. Es wurde ein etabliertes Modell zur Frakturheilung nach Stabilisierung durch Marknägel an Rattentibae verwendet (83).

### 8.1 Peri- und ostoperativer Verlauf

Von den ursprünglich jeweils zehn Tieren in den sechs Gruppen kam es im Wesentlichen an zwei Abschnitten des Versuchs zu Ausfällen.

- Periinterventionell: Trümmerfrakturen, Pseudarthrosen und Narkosezwischenfälle
- Postinterventionell: Marknagelextraktion und Umstellung der histologischen Aufarbeitung

Periinterventionell verstarben während der Nagetiernarkose vier Tiere wegen eines Narkosezwischenfalls (92).

Die verbleibenden 56 Ratten konnten ihre Läufe meist am ersten postoperativen Tag wieder voll belasten. Sie aßen und tranken gut, so dass abschließend von einer guten OP-Toleranz gesprochen werden konnte.

Postoperativ wurden die Tiere bei den Zwischenuntersuchungen immer wieder evaluiert, so dass darüber hinaus wegen klinischer Anzeichen von Trümmerfrakturen, Infektionen, Kompartimentbildungen oder Frakturheilungsstörungen weitere zwei Tiere aus dem Versuch genommen werden mussten. Laborchemisch kam es zu keinen relevanten Abweichungen (1).

Während die periinterventionellen und postoperativen Ausfälle versuchsübergreifend vergleichbar zu den Vorversuchen der Arbeitsgruppe von Schmidmaier et al. waren (93), ergaben sich nach Abschluss des operativen Teils, also vor der eigentlichen Auswertung, zwei komplexe Schwierigkeiten, die zum Auswertungsausschluss führten. Zum einen barsten in den zwölf-Wochen-BIS-Gruppen (BIS12) drei der Proben beim Entfernen des Marknagels. Die geborstenen Tibiae waren so für den Versuch unverwertbar. In den Vergleichsgruppen nur mit PDLLA beschichtet (PDLLA12) und ohne Beschichtung (CTRL12) barst bei der Drahtextraktion jeweils eine Tibia. In der

BIS12-Gruppe waren also gleich dreimal so viele Marknägel derart eingewachsen, dass ein zerstörungsfreies Entfernen nicht möglich war.

Zum anderen gab es eine unter Kapitel 7.2.2 beschriebene Komplikation in der histologischen Aufarbeitung. Während der Färbung nach Safranin-O/Lichtgrün kam es aufgrund einer chemischen Reaktion zu einer Zerstörung von zwölf Präparaten. Da die histologische Aufarbeitung mit den Zwölf-Wochen-Tieren begonnen wurde, waren dort auch die größten Verluste zu verzeichnen.

Noch am Tag der Untersuchung wurden die Röntgenplatten entwickelt und primär beurteilt. Primäre und sekundäre Wundheilungsstörungen wurden auf diese Weise erkannt, und die Tiere vorzeitig getötet, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt war:

- eine trotz Reposition stark dislozierte Fraktur,
- eine Fraktur, die mehrfragmentig war und nach AO-Klassifikation als komplizierte Fraktur mit einem hohen Pseudarthrosrisiko verhaftet war,
- eine Fraktur, die bereits Zeichen einer deutlich verzögerten Frakturheilung aufwies.

Zum Abschluss des Versuchs wurden die Röntgenbilder durch die Arbeitsgruppe ausgewertet, und der Kallusdurchmesser statistisch verglichen (1). Die Auswertung ergab eine größere mittlere Kallusfläche bei den sechs- und zwölf-Wochen-Tieren mit einem mit PDLLA (PDLLA) und Bisphosphonat beschichteten (BIS) Nagel im Vergleich zu den unbeschichteten (CTRL) Marknägeln.

## 8.2 Histologische und histomorphometrische Beurteilung

### 8.2.1 Histologie

Nach sechs Wochen zeigten alle ausgewerteten Präparaten die typischen Zeichen der sekundären Frakturheilung mit deutlicher Kallusbildung. Der Kallus überbrückt den Frakturspalt und sorgt nach vollständiger Mineralisierung nach etwa sechs Wochen für eine ausreichende Belastungsstabilität (94) (Tabelle 8).

Deswegen hat die histologische und histomorphometrische Beurteilung des Kallus eine besondere Relevanz in der Untersuchung der Frakturheilung.

In der Arbeit von Gerstenfeld et al. wird die Histologie den Stadien der Frakturheilung zugeordnet. (95) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Histologische Einteilung der sekundären Frakturheilung, (94)

Zeitablauf	Stadium	Radiologisch
<b>3. Tag</b>	Entzündungsphase	3.-14. Tag: Entwicklung und Organisation eines Hämatoms mit dem Beginn der Granulation entlang des Fibringeflechts
<b>2-3 Woche</b>	Granulationsphase	ab 14. Tag: Periostale Reaktion mit Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und der Mineralisierung entlang der intermembranösen und enchondralen Matrix
<b>3-6 Wochen bis 3.-4. Monat</b>	Kallushärtung	ab 6. Woche: Umbau des knorpeligen Kallus in mineralisierten Kallus Überbrückung und Durchbauung, die Knochenverdichtung ist scharfrandig
<b>Ab dem 4. Monat</b>	Modeling und Remodeling	vollständiger Einbau des Knochens vom Kallus bis zur Restitutio ad Integrum

Zur Beurteilung der Fraktur und des Kallus wurden die Präparate einheitlich ausgerichtet und eine ROI festgelegt. Hierfür wurde mit Diameter (im Folgenden Baseline) mal 1,5facher Tibiaschaftausdehnung die ROI festgelegt (Kapitel 7.2.3). Im Anschluss wurde das Präparat innerhalb der ROI in periostalen und endostalen Kallus unterteilt und die Kortikalizes markiert und beurteilt. Dabei hatte der endostale Kallus wegen des vormals implantierten Marknagels wenig Raum zur Ausbildung und war im Verhältnis zum periostalen Kallus deutlich weniger umfangreich (Abbildung 13).

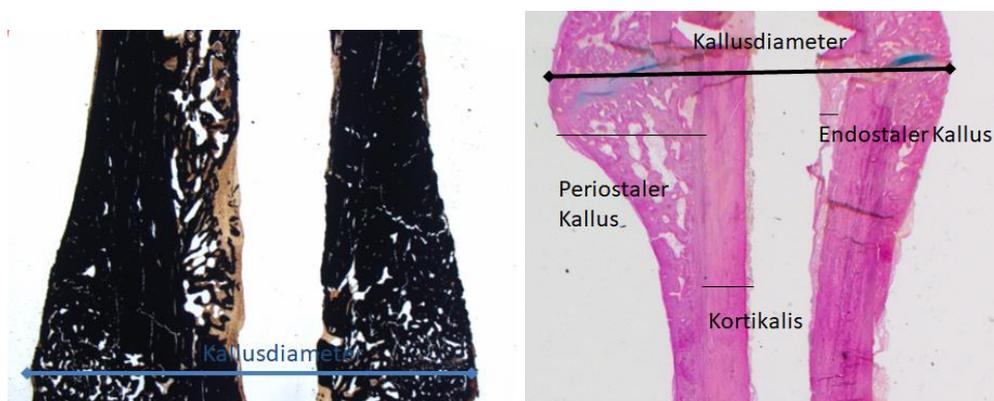


Abbildung 13: Links: nach von Kossa gefärbt mit Kallusdiameter; rechts: nach Methylgrün/van Gieson mit der Topografie Kortikalis, end- und periostaler Kallus

Nach sechs Wochen hatten sich die Kallusse in guter Ausprägung gebildet und waren schon zum großen Teil mineralisiert. Es waren jedoch noch wesentliche knorpelige

Strukturen zu erkennen, die als Zeichen der noch nicht vollständigen Kallusmineralisierung gedeutet werden können.

Nach zwölf Wochen waren die Kallusse noch nicht vollständig resorbiert. Im Gegenteil nahmen sie in der BIS- und PDLLA-Gruppe sogar noch an Größe zu. Bis auf einen Ausreißer waren in den Kallussen auch praktisch keine Knorpelanteile mehr zu sehen (Abbildung 14).

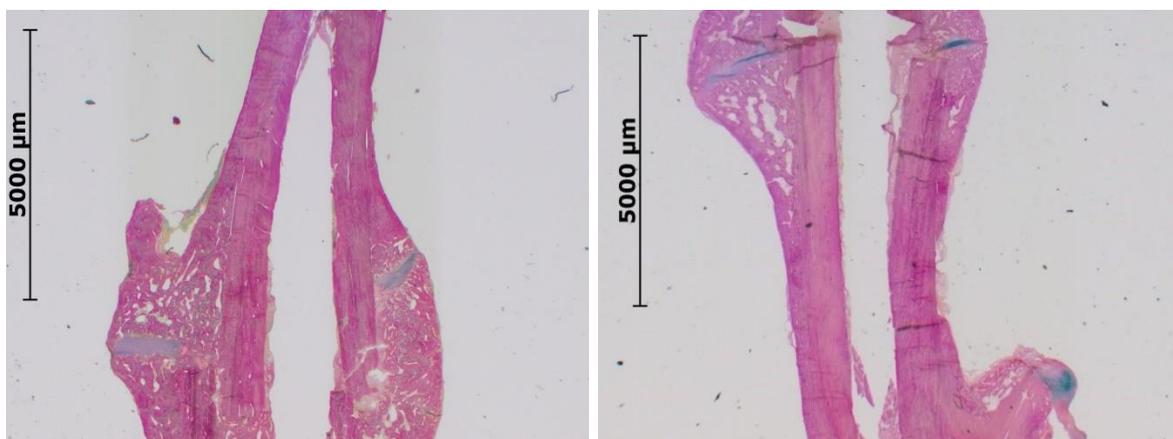


Abbildung 14: Rattentibia in Methylgrün/van Gieson gefärbt; nach Extraktion eines mit BIS beschichteten Marknagels; links: sechs Wochen nach Fraktur, rechts zwölf Wochen nach Fraktur; links sind noch deutliche Knorpelanteile im Kallus zu erkennen, rechts sind nur noch Knorpelanteile im Frakturspalt zu sehen.

### 8.2.2 Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Beurteilung wurde der Kallus auf eine ROI begrenzt. Jede Probe wurde hierfür dreimal ausgemessen, um auf diese Weise Fehlmessungen auszuschließen. Darüber hinaus wurden die Präparate sowohl in der Methylgrün/van-Gieson- als auch in der von-Kossa-Färbung beurteilt, so dass für jedes Präparat ein Mittelwert von vier Kortikalisdiametern (je lateral und medial, distal und proximal) erfasst wurde. Daraus wurden Mediane der Kortikalisdiameter berechnet, die sich nicht signifikant unterschieden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Median Kortikalisdiameter 6-Wochen-Präparate

Gruppe	Anzahl	Median in mm Kortikalisdiameter
BIS06	7	2,50
PDLLA06	8	2,32
CTRL06	7	2,54

Da die Kortikalisdiameter durch die Frakturierung nicht relevant alteriert werden sollten, gewährleisteten sie eine konsistente ROI. In den Ergebnissen gab es in allen Gruppen Ausreißer, aber das Gros der Werte verteilte sich weitestgehend gleichmäßig um den Median. Es ergaben sich in der statistischen Auswertung im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15).

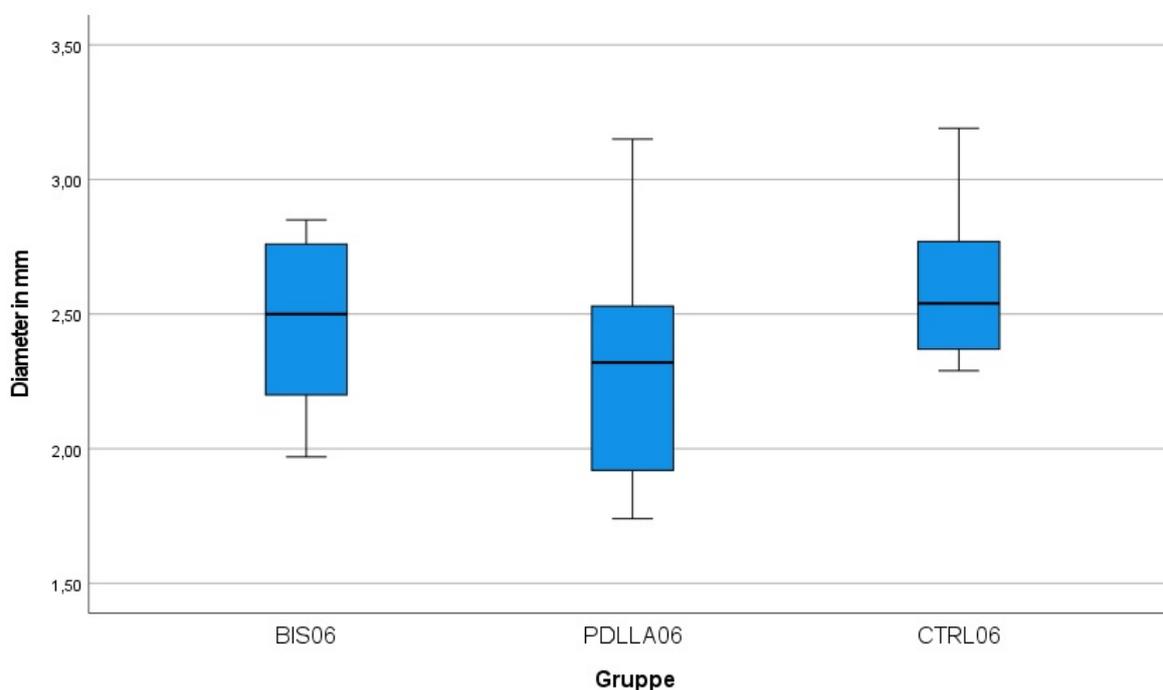


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der Kortikalisdiameter der 6-Wochen-Präparate v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Bei den zwölf-Wochen-Präparaten waren die Kortikalizes weitestgehend mineralisiert überbrückt (Abbildung 16). Die Kortikalisdiameter hatten zugenommen und die Kallusse waren stärker mineralisiert.

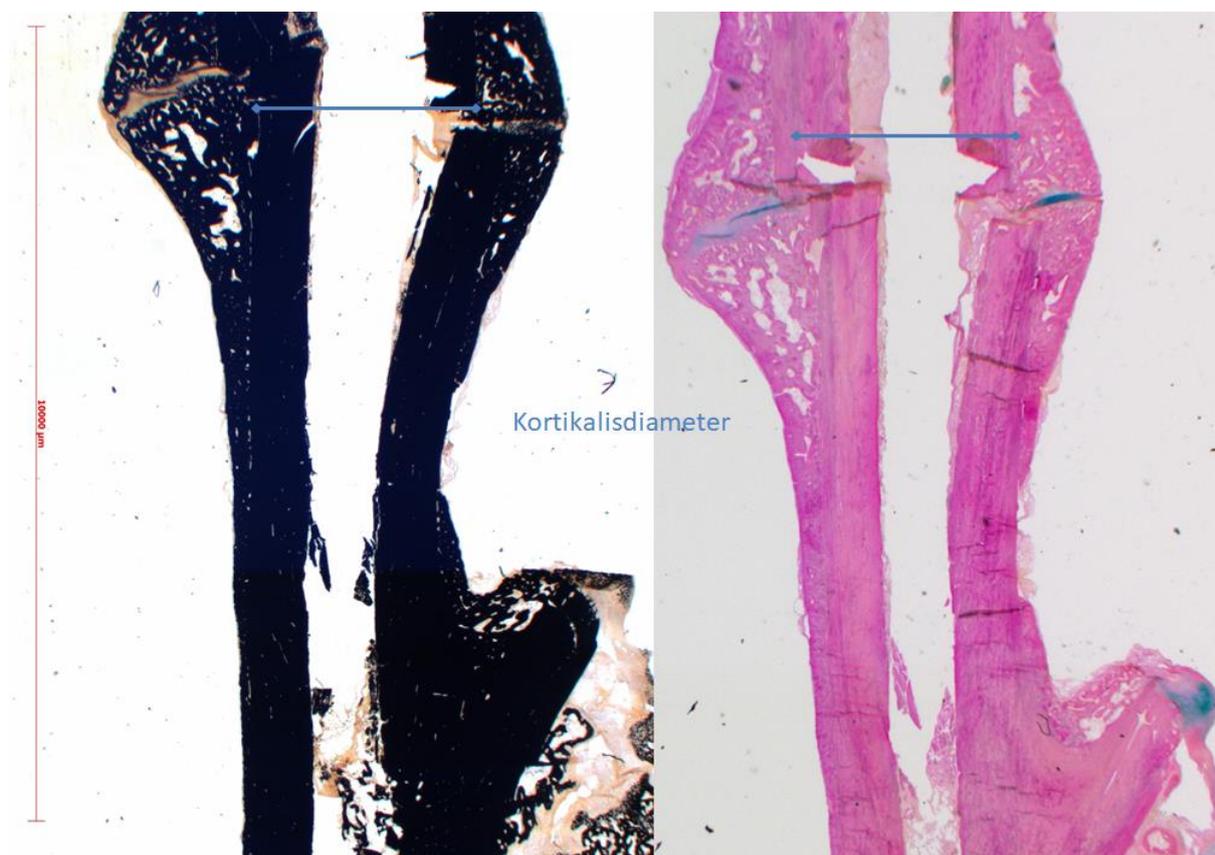


Abbildung 16: Kortikalisdiameter in beiden Färbungen nach 12 Wochen; links: von Kossa; rechts: Methylgrün/van Gieson gefärbt

Tabelle 10: Median Kortikalisdiameter 12-Wochen-Präparate

Gruppe	Anzahl	Median in mm Kortikalisdiameter
<b>BIS12</b>	6	2,84
<b>PDLLA12</b>	5	2,86
<b>CTRL12</b>	4	2,62

In der Boxplotdarstellung ist zu sehen, dass die Kortikalisdiameter in der zwölf-Wochen-Bisphosphonatgruppe denen der sechs-Wochen Gruppen tendenziell etwas überlegen waren, jedoch konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden (Abbildung 17).

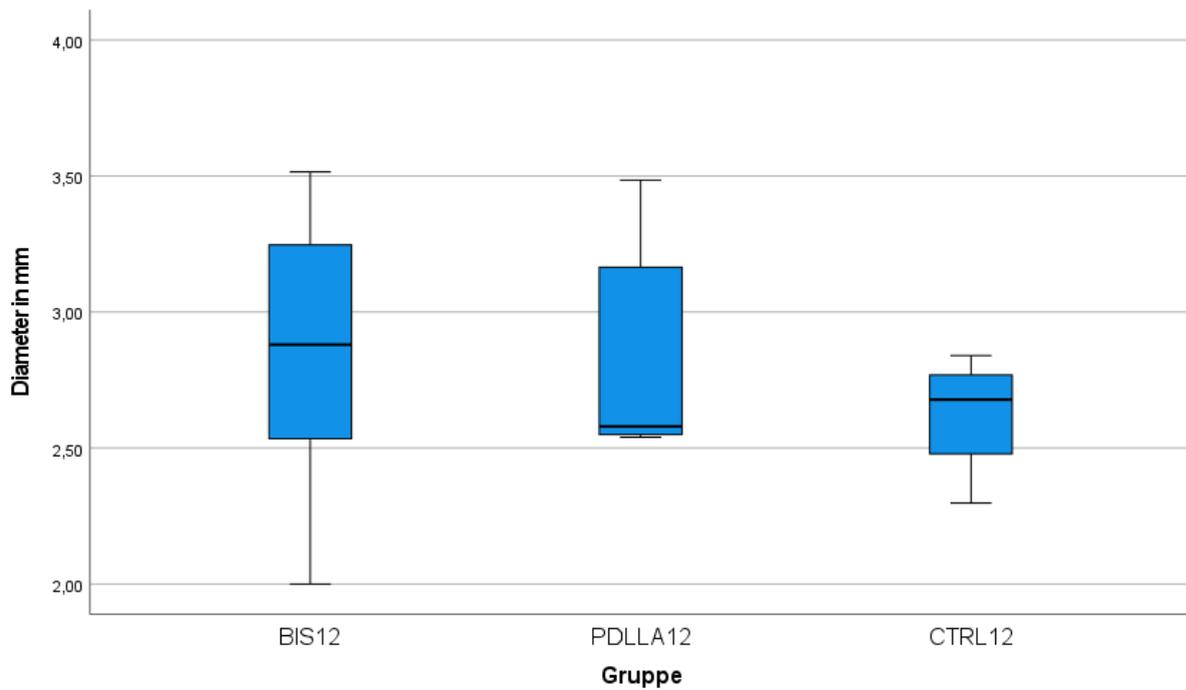


Abbildung 17: Boxplot-Darstellung der Kortikalisdiameter der 12-Wochen-Präparate v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Da der Kruskal-Wallis-Test keine Signifikanz zeigte, waren auch keinerlei post-hoc-Tests notwendig. Es gibt eine Tendenz zugunsten der Bisphosphonatbeschichtung, aber keine statistische Signifikanz.

Mikroskopisch wurde auch die gesamte Kallusfläche in der ROI bestimmt und beurteilt. Hierfür wurde die gesamte gefärbte Fläche, peri- und endostaler Kallus sowie Kortikalis innerhalb der ROI berechnet (Abbildung 18).

Die Ergebnisse im Mann-Whitney-U-Test hatten wegen der breiten Streuung, der Heteroskedastizität, wenig Effektstärke und Power. Einzig bezüglich der Kallus- und Kortikalismineralisierung ergab sich in beiden Standzeiten eine relevante Effektstärke. Mit der vorliegenden Gruppengröße hätten die Ergebnisse auch eine geringe, zum Teil auch mittlere Power erreichen können.

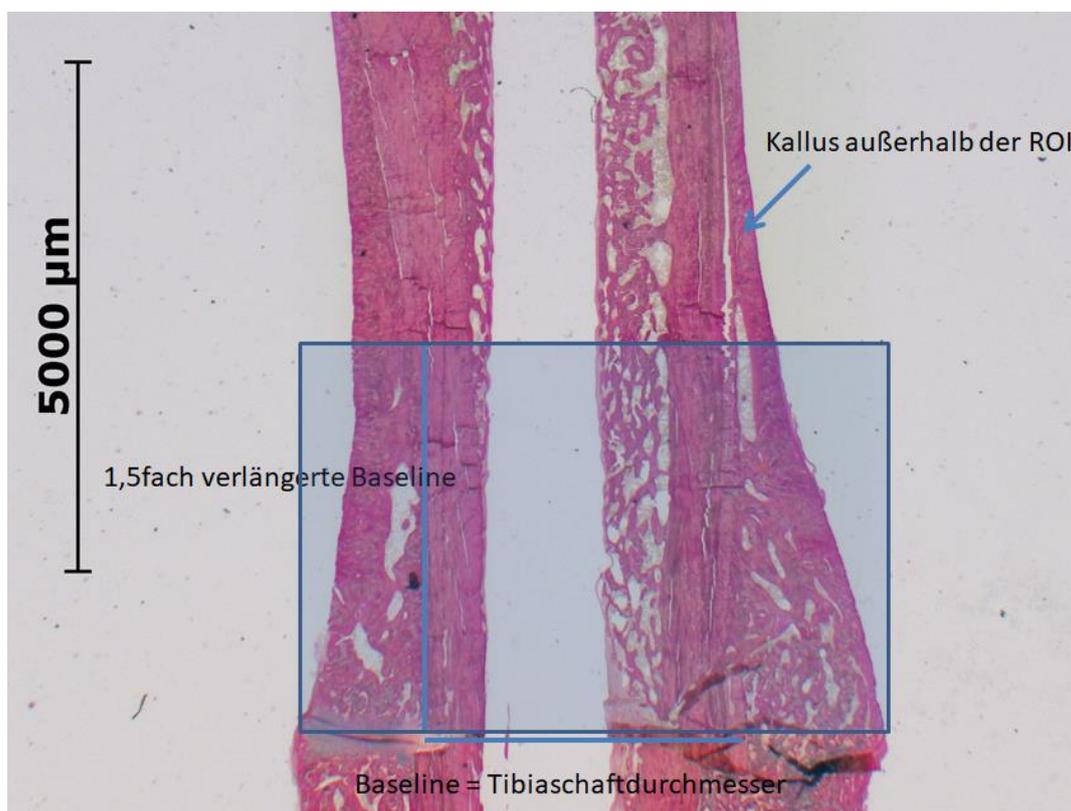


Abbildung 18: Kallusfläche innerhalb der Region of Interest (Baseline x 1,5-fache Baseline erweitert auf Kallusdiameter)

Die Kallusflächen waren nach sechs Wochen relativ homogen (Abbildung 19). Nach zwölf Wochen nahm die Kallusfläche in der ROI im Vergleich zu den sechs-Wochen-Werten zu. Die mit Bisphosphonat behandelten Präparate (BIS) waren nach zwölf Wochen im Median tendenziell größer als der Median der Kontrollgruppe (CTRL) und mit PDLLA-Beschichtung (PDLLA). Es ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 20). Angemerkt sei noch, dass die Gesamtkallusfläche in der ROI einzig in der unbeschichteten Kontrollgruppe abnahm.

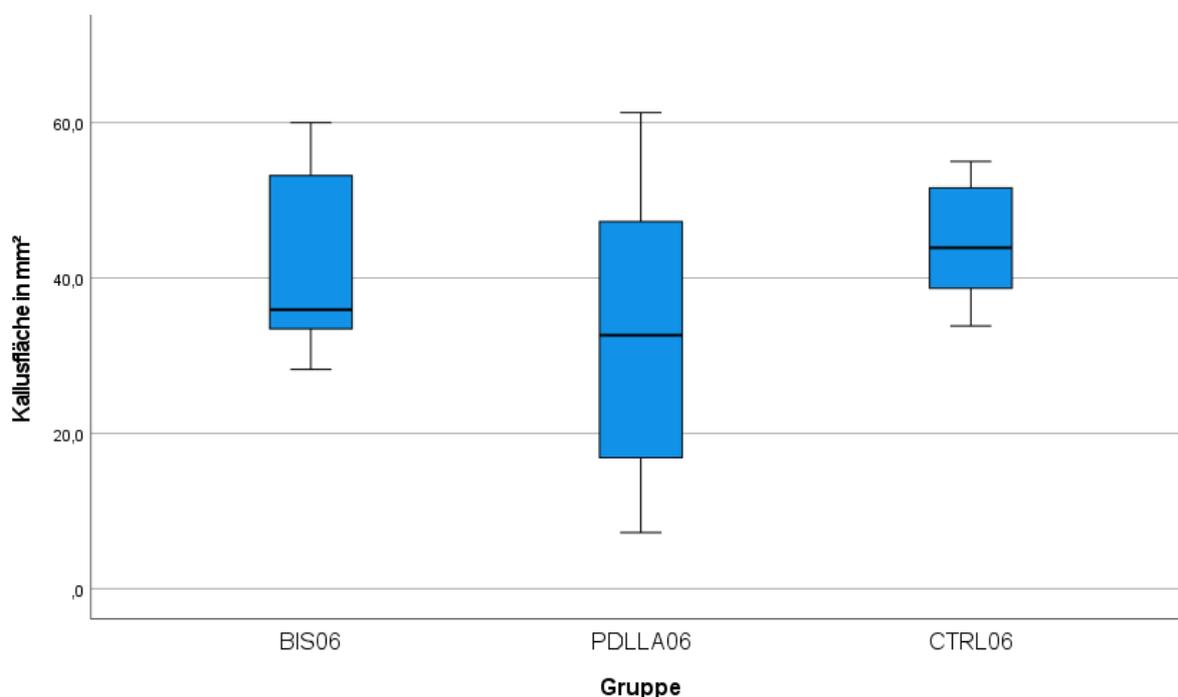


Abbildung 19: Boxplot-Darstellung der Kallusfläche in der ROI in von-Kossa-gefärbten 6-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

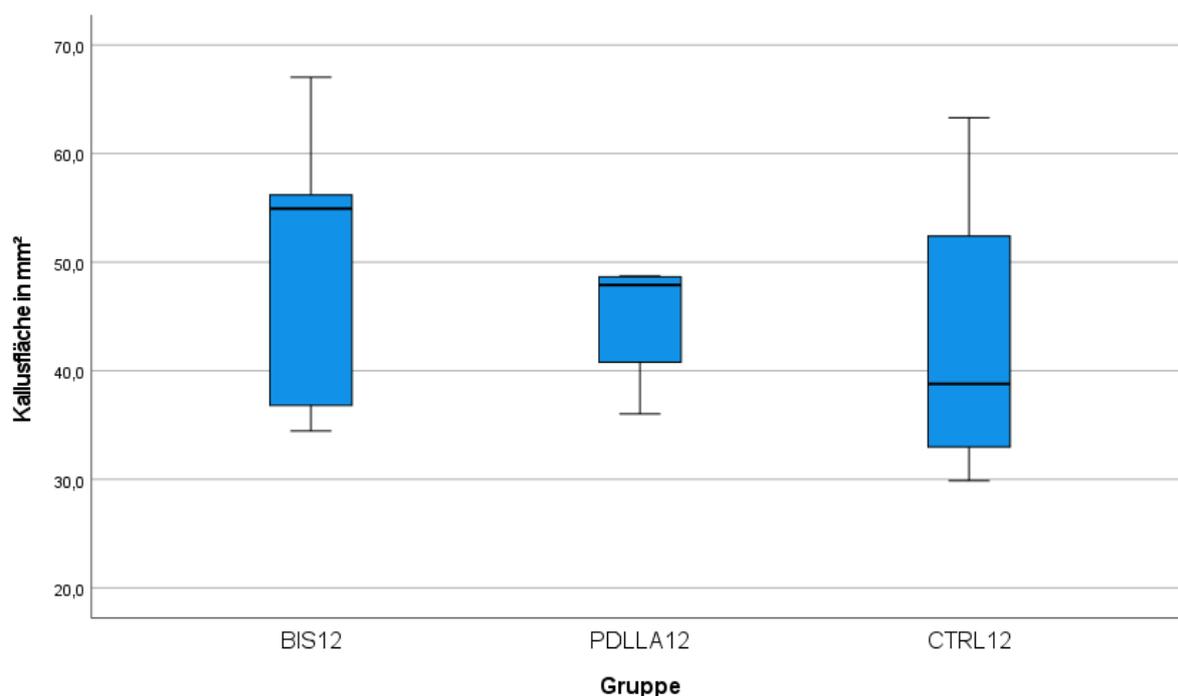


Abbildung 20: Boxplot-Darstellung der Kallusfläche gemessen in der ROI in von-Kossa-gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

### Mineralisierung in der Versilberung nach von Kossa des Kallus

Zur Quantifizierung der Frakturheilung wurde die Kallusmineralisierung herangezogen. Der endostale Kallus (Abbildung 21) war wegen der Marknagelhöhle wenig ausgeprägt und nahm nur einen kleinen Anteil an der Kallusfläche in der ROI ein.

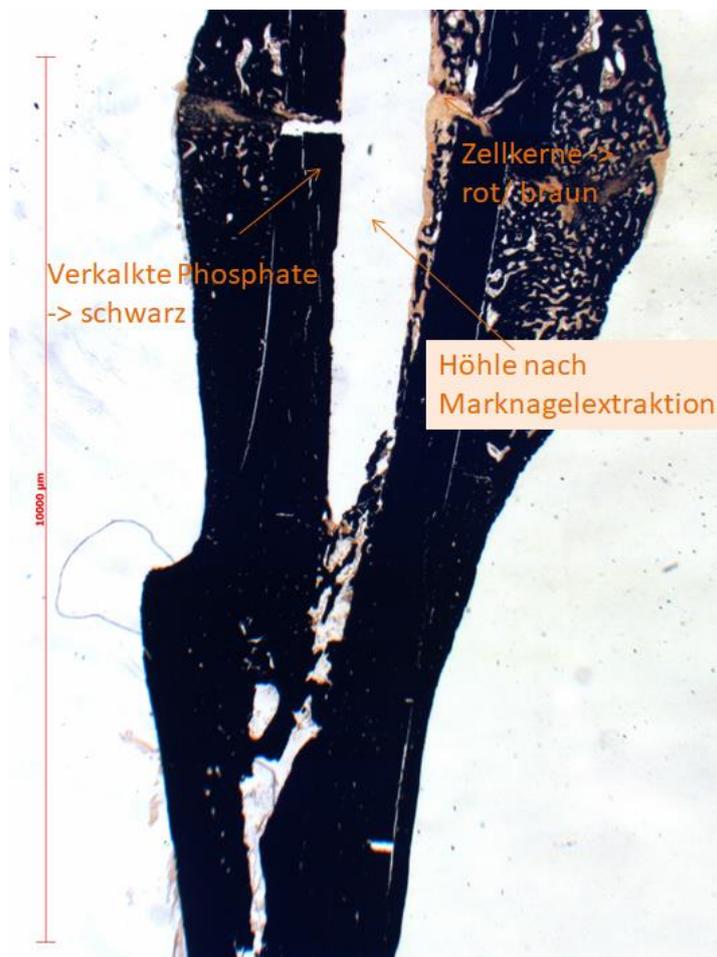


Abbildung 21: Histologisches Präparat der distalen Tibia nach von Kossa gefärbt nach sechs Wochen Standzeit mit Bisphosphonat

Wie bereits in Kapitel 7.2.3 im Abschnitt „Histomorphometrische Auswertung“ beschrieben wurde die gesamte Kallusfläche bestehend aus end- und periostalem Kallus in der ROI berechnet. Als Grad der Mineralisierung wurde der Quotient aus mineralisiertem Kallus zum Gesamtkallus gebildet.

Es konnte bereits histologisch nach der Färbung gesehen werden, dass bei den sechs-Wochen-Tieren der Kallus mehrheitlich aus Geflechtknochen bestand, der noch nicht vollständig mineralisiert war (Abbildung 14; Abbildung 16). Zwischen den einzelnen Gruppen konnte aber weder histologisch noch histomorphometrisch ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 22). Auch hier waren in der Boxplot-Darstellung die Verteilungsmuster weitestgehend gleichmäßig um den Median verteilt.

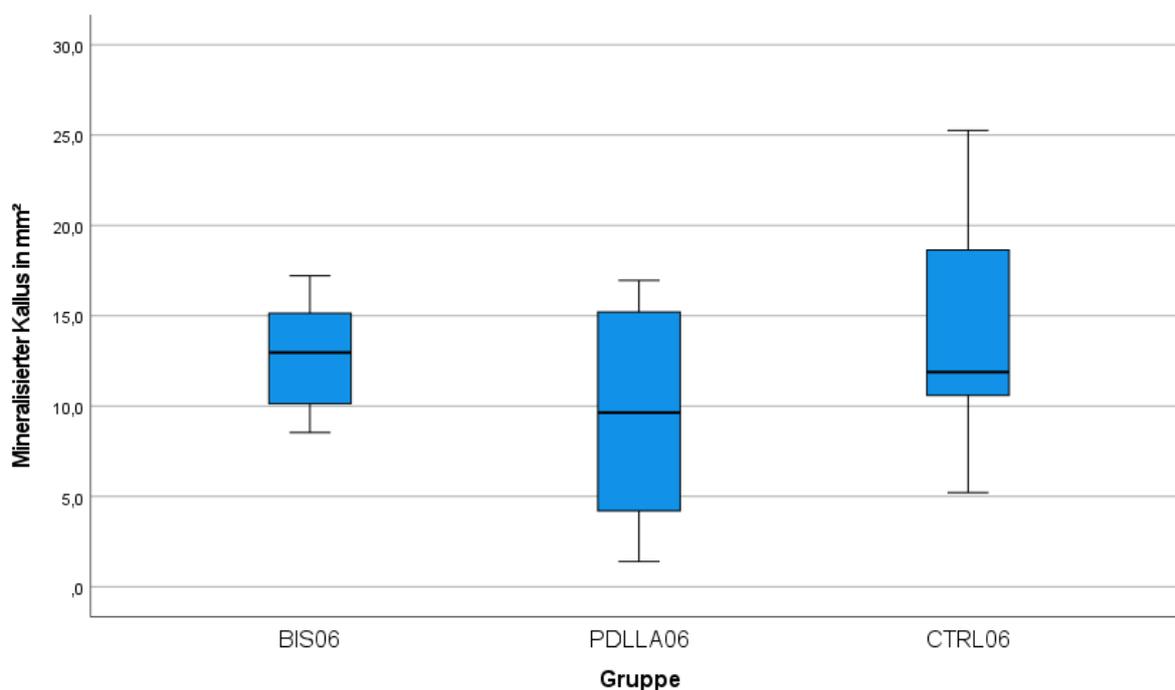


Abbildung 22: Boxplot-Darstellung der prozentualen Mineralisierung in von Kossa gefärbten 6-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Die Zusammensetzung des Kallus zeigte bei den sechs-Wochen-Präparaten eine deutliche geringere Dichte im Vergleich zur Kortikalis, was sich auch im niedrigeren Anteil der Mineralisierung des Kallus widerspiegelt (Tabelle 11; Tabelle 12).

Tabelle 11: Median der prozentualen Mineralisierung der Kallusse in von-Kossa-gefärbten 6-Wochen-Präparaten

Gruppe	Anzahl	ROI mineral. Kallus in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kallus in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kallus in %
BIS06	7	22,82	12,97	56,84
PDLLA06	8	17,36	9,64	55,53
CTRL06	7	24,02	11,89	49,50

Die Kortikalis war nach sechs Wochen wenig alteriert. Die Mineralisierung betrug gruppenübergreifend 93% und unterschied sich somit nicht (Tabelle 12).

Tabelle 12: Median der prozentualen Mineralisierung der Kortikalizes in von-Kossa-gefärbten 6-  
Wochen-Präparaten

Gruppe	Anzahl	ROI mineral. Kortikalis in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kortikalis in %	Nicht mineralisierte Kortikalis in %
<b>BIS06</b>	7	10,84	93,22	1,06
<b>PDLLA06</b>	8	9,32	93,96	0,75
<b>CTRL06</b>	7	12,68	93,42	0,86

Nach zwölf Wochen steigerte sich der mineralisierte Anteil des Gesamtkallus (Tabelle 13). In der Zusammenschau mit den Kortikalisdiametern scheint die Kallus-Qualität, im Sinne einer besseren Mineralisierung und einer größeren Fläche, zuzunehmen. Bei allen Präparaten nahmen die Kortikalisdiameter bis zur zwölften Woche zu. Auch die Mineralisierung der Kallusse glich sich zunehmend der der Kortikalis an.

Tabelle 13: Median der prozentualen Mineralisierung der Kallusse in von-Kossa-gefärbten 12-Wochen-  
Präparaten

Gruppe	Anzahl	ROI mineral. Kallus in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kallus in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kallus in %
<b>BIS12</b>	6	20,36	13,78	67,68
<b>PDLLA12</b>	5	20,04	15,39	76,80
<b>CTRL12</b>	4	22,96	15,06	65,59

Der vermutete Effekt der verstärkten Mineralisierung unter den Gruppen der jeweiligen Beschichtungen konnte aber nicht bewiesen werden. In der Boxplot-Darstellung wird deutlich, dass es keinen relevanten Unterschied bezüglich der Kallusmineralisierung zwischen den drei Beschichtungen gibt (Abbildung 22; Abbildung 23).

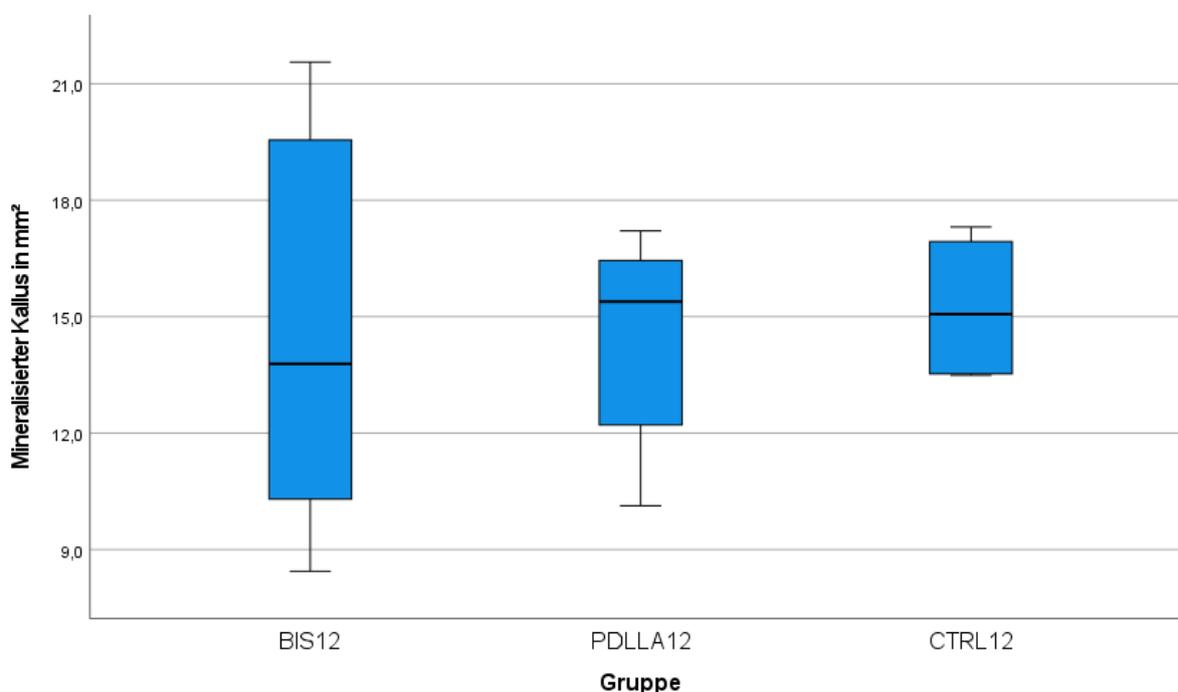


Abbildung 23: Boxplot-Darstellung der prozentualen Mineralisierung in von Kossa gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Nach zwölf Wochen glich sich die Mineralisierung der Kallusse der der Kortikalizes an. Jedoch nahm die Mineralisierung in den beiden Kontrollgruppen deutlich mehr zu. So blieb die mineralisierte Fläche des Kallus bei knapp unter 15 mm<sup>2</sup>, wo sie bereits nach sechs Wochen war. Die PDLLA und die Kontrollgruppe hingegen konnten sich von 10 - 12 mm<sup>2</sup> auf über 15 mm<sup>2</sup> steigern (Tabelle 14) (Abbildung 19; Abbildung 20).

Tabelle 14: Median der prozentualen Mineralisierung der Kortikalizes in von Kossa gefärbten 12-Wochen-Präparaten

Gruppe	Anzahl	ROI mineral. Kortikalis in mm <sup>2</sup>	Mineral. Kortikalis in %	Nicht mineralisierte Kortikalis in %
BIS12	6	9,77	91,5	1,36
PDLLA12	5	13,12	50,3	49,13
CTRL12	4	12,7	49,1	49,11

### Knorpelanteil in Methylgrün/van-Gieson-Färbung periostaler Kallus

Die Methylgrünfärbung ist ein kationischer Farbstoff, der sich an die Basenpaare der Nukleinsäuren anhaftet und so den Zellkern und die Mitochondrien grün färbt. In der Gegenfärbung wird die van-Gieson-Lösung eingesetzt, die sich aus Pikrinsäure und Säurefuchsin zusammensetzt. Das Pikrinsäure-Fuchsin-Gemisch färbt das Kollagen rot und setzt es somit von der nicht kollagenhaltigen, gelb gefärbten Umgebung ab.

## Ergebnisse

Durch die Vorfärbung mit Methylgrün werden die blauen Zellkerne nochmals übergefärbt und ergeben so eine türkisgrüne Färbung. Sie dient der Darstellung der extrazellulären Matrix und der nicht mineralisierten Anteile des Kallus.

In der Histomorphometrie wurden die gefärbten Flächen zur Quantifizierung des knorpeligen, nicht mineralisierten Anteils bemessen. Nach sechs Wochen lag der Mittelwert des nicht mineralisierten Knochens bei unter 10 % (Tabelle 15).

Tabelle 15: Median des Knorpelanteils des Kallus bei den 6-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson

Gruppe	Anzahl	ROI Knorpel Kallus in mm <sup>2</sup>	Knorpel im Kallus in mm <sup>2</sup>	Knorpel im Kallus in %
BIS06	7	13,12	0,20	2,5
PDLLA06	8	13,98	0,13	2,7
CTRL06	7	8,82	0,51	8,1

In der Boxplot-Darstellung ist zu sehen, dass der Median der Gruppen auf vergleichbarem Niveau liegt. In der Tendenz sind die mit Bisphosphonatbeschichtung therapierten Präparate leicht unter den Werten der Vergleichsgruppe, aber im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich dahingehend keine Signifikanz (Abbildung 24).

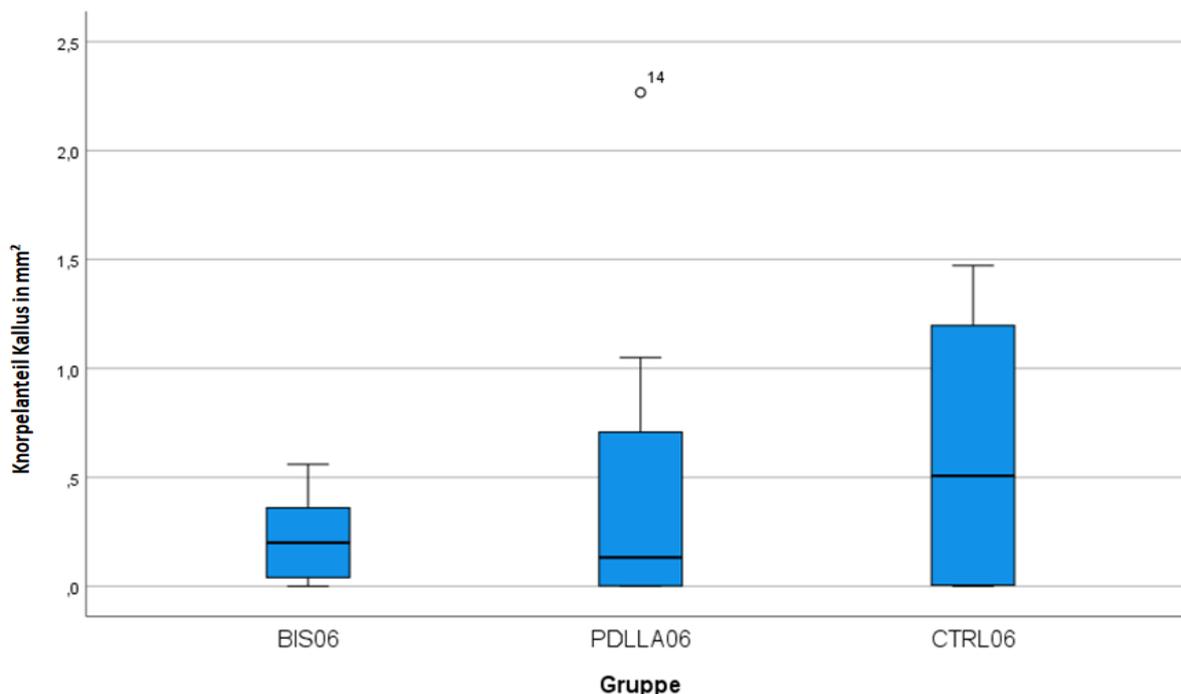


Abbildung 24: Boxplot-Darstellung des prozentual Knorpelanteil in Methylgrün/van Gieson gefärbten 6-Woche-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Im Vergleich hatte die Kortikalis bereits nach sechs Wochen einen zu vernachlässigenden Knorpelanteil, was in dieser Phase der Frakturheilung auch zu erwarten war (Tabelle 16).

Tabelle 16: Median des Knorpelanteils der Kortikalis bei den 6-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson

Gruppe	Anzahl	ROI Kortikalis in mm <sup>2</sup>	Knorpel Kortikalis in mm <sup>2</sup>	Knorpel Kortikalis in %
BIS06	7	9,08	0,00	0,00
PDLLA06	8	11,65	0,04	0,38
CTRL06	7	11,08	0,00	0,00

Nach zwölf Wochen wuchs der Kallus aus Geflechtknochen weiter, verdichtete sich und mineralisierte zunehmend (Tabelle 17). Der Median des Knorpels in der Kortikalis lag bei null Prozent (Tabelle 18).

Tabelle 17: Median des Knorpelanteils des Kallus bei den 12-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson

Gruppe	Anzahl	ROI Kallus in mm <sup>2</sup>	Knorpel im Kallus in mm <sup>2</sup>	Knorpel im Kallus in %
BIS12	6	8,65	0,00	0,0
PDLLA12	5	11,24	0,00	0,0
CTRL12	4	7,56	0,00	0,0

Dabei waren die Knorpelflächen (Abbildung 18) vergleichbar mit den berechneten Flächen in der Versilberung nach von Kossa. Es zeichnet sich also in allen Gruppen ein Bild eines nach zwölf Wochen kompakteren und mineralisierteren Kallus ab. In der Boxplot-Darstellung kann eine etwas größere, aber nicht signifikante Streuung zugunsten des nicht-mineralisierten Anteils gesehen werden (Abbildung 25).

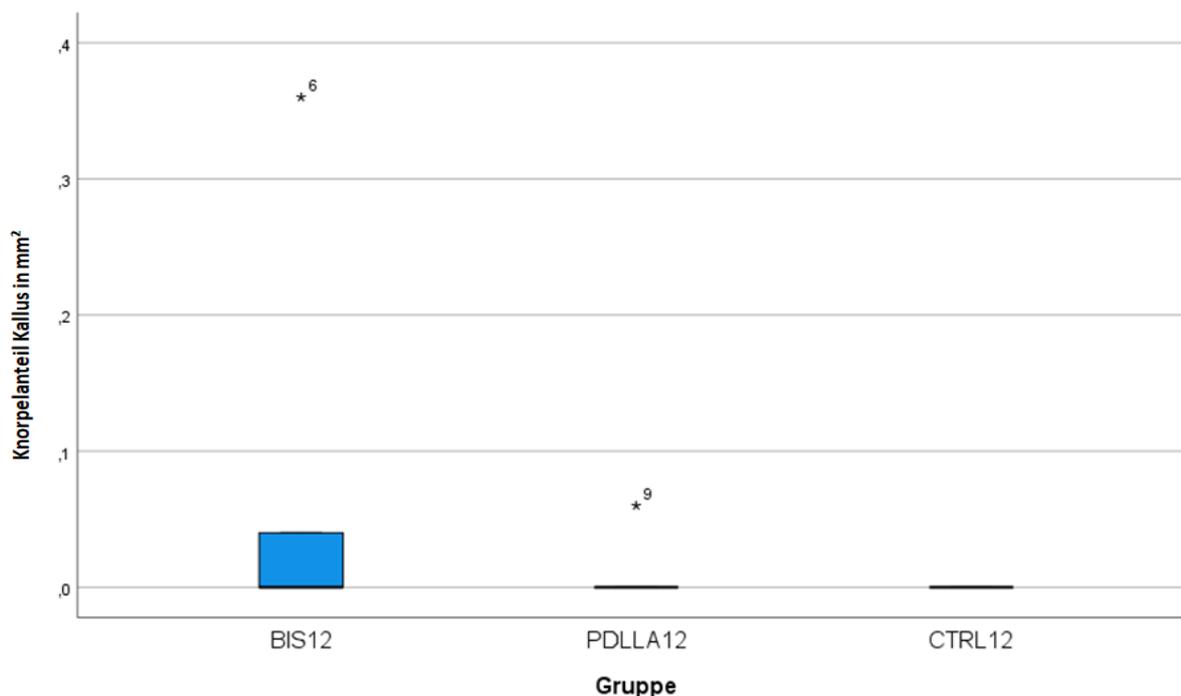


Abbildung 25: Boxplot-Darstellung des prozentualen Knorpelanteils in Methylgrün/van-Gieson gefärbten 12-Wochen-Präparaten v. l. n. r.: Bisphosphonat in PDLLA, PDLLA und unbeschichtete Kontrollgruppe

Nach zwölf Wochen war die Kortikaliszusammensetzung unverändert. In der Zusammenschau mit der Mineralisierung in der von-Kossa-Färbung zeigt sich die konstante Zusammensetzung der Kortikalis (Tabelle 14; Tabelle 18).

Tabelle 18: Median des Knorpelanteils des Kortikalis bei den 12-Wochen-Präparaten in Methylgrün/van Gieson

Gruppe	Anzahl	ROI Kortikalis	Knorpel Kortikalis in mm <sup>2</sup>	Knorpel Kortikalis in %
BIS12	6	10,59	0	0
PDLLA12	5	10,08	0	0
CTRL12	4	11,125	0	0

## 9 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung lokal applizierter Bisphosphonate aus einem PDLLA-beschichteten Marknagel auf die Frakturheilung der frakturierten Rattentibia untersucht.

Wegen der eingangs beschriebenen Bedeutung der Fraktur der langen Röhrenknochen besteht für die Frakturheilung hoher Forschungsbedarf. Besondere klinische Relevanz haben Therapieansätze, welche die Frakturheilung verkürzen könnten, um die mit einer langen Immobilisation verbundenen Komplikationen für Patientinnen und Patienten zu vermeiden.

Zunächst sollen die Ergebnisse, anschließend die einzelnen Aspekte der Studie diskutiert werden, auch in Hinblick auf ihre möglichen Limitierungen.

### 9.1 Ergebnisse und deren Einordnung

Um die lokale Wirkung von Bisphosphonaten auf die Frakturheilung zu beurteilen, haben Greiner et al. in-vitro-Versuche bezüglich der Wirkung von Bisphosphonaten auf Knochenzellen durchgeführt (82; 96). Dort konnten positive Einflüsse auf die Osteoblasten und eine Hemmung der Osteoklasten gezeigt werden. Neben in-vitro-Verfahren ist es wegen der hochkomplexen Stoffwechselfvorgänge zur Implementierung neuer Verfahren auch heute noch notwendig Tierversuche durchzuführen. Hierfür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 60 weibliche Sprague-Dawley-Ratten operiert. Diesen wurden in Narkose und unter vereinheitlichten Bedingungen die rechte Tibia frakturiert, welche mit einem Titan-Kirschnerdraht als Marknagelung operativ versorgt wurde. Der Titan-Kirschnerdraht war entweder mit Zoledronsäure – dem aktuell potentesten Bisphosphonat in der Humanmedizin – in PDLLA (BIS), nur mit PDLLA (PDLLA) beschichtet oder unbeschichtet (CTRL). Nach sechs (n=22) oder zwölf (n=15) Wochen konnten 37 der behandelten Tibiae histologisch beurteilt und histomorphometrisch untersucht werden. Für die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurden der Diameter und die Kallusfläche in der ROI bestimmt. Darüber hinaus wurde die Mineralisierung und der Kollagenanteil im Kallus histomorphometrisch quantifiziert. Die Kallusgröße wurde mittels der Kallusfläche innerhalb der ROI verglichen. Die Ergebnisse in den drei Gruppen zu den beiden Standzeiten unterschieden sich nicht

signifikant. Nach einer Standzeit von zwölf Wochen waren die Kallusflächen in der ROI der mit Bisphosphonaten behandelten Tibiae zwar tendenziell größer, aber nicht signifikant erhöht.

In der Histomorphometrie konnte zudem in allen Gruppen eine Zunahme der Mineralisierung nach zwölf Wochen gezeigt werden. Jedoch stieg die Mineralisierung in den beiden Kontrollgruppen stärker als in der mit Bisphosphonat behandelten Gruppe (Abbildung 19; Abbildung 20). In beiden Kontrollgruppen stieg die mineralisierte Fläche von 10-12 mm<sup>2</sup> auf über 15mm<sup>2</sup>, was einer Größenzunahme von mehr als 25% entspricht. Die Signifikanz blieb jedoch aus.

Der Knorpelanteil im Kallus war nach sechs Wochen in den beiden Gruppen mit Beschichtung vergleichbar bei unter 3%, beim unbeschichteten Nagel im Median bei 8,1%, also tendenziell, aber nicht signifikant höher. Erwartungsgemäß war nach zwölf Wochen, bis auf einen Ausreißer, kein quantifizierbarer Kollagenanteil in den Kallussen nachweisbar. Der Kallus ist in der Umbauphase der Frakturheilung üblicherweise voll mineralisiert. Erst ab diesem Zeitpunkt beginnt das Remodeling und der Kallus wird zurückgebaut.

Im Ergebnis wiesen die mit Bisphosphonat behandelten Präparate in der histologischen Beschaffenheit und der histomorphometrischen Messungen der frakturierten Rattentibia keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichsgruppen auf. Der Heilungsverlauf verlief regelrecht. Nach zwölf Wochen waren, bis auf einen Ausreißer, alle Frakturspalte mit knorpelfreiem Kallus überbrückt.

Lediglich ein mit Bisphosphonat behandelter Kallus hatte nach zwölf Wochen noch Kollagenanteile. Es war das einzige Präparat, das nicht vollständig knöchern überbrückt war. Der Kollagenanteil befand sich ausschließlich im Frakturspalt. Über die genauen Ursachen kann nur gemutmaßt werden. Dieser Umstand könnte auf das Bisphosphonat zurückzuführen sein, ist aber wahrscheinlicher eine Frakturheilungsstörung bei unvollständig überbrücktem Frakturspalt.

Damit wurde die Arbeitshypothese statistisch nicht bestätigt. Die Ergebnisse sind nicht signifikant, können aber in der Zusammenschau durchaus Basis für weitere Untersuchungen sein.

Nach sechs und zwölf Wochen Therapie mit lokalem Zoledronat aus einer PDLLA-Beschichtung konnten keine statistisch nachweisbar nachteiligen Wirkungen auf die Kallusbeschaffenheit beobachtet werden konnten.

Dass keine Signifikanz erreicht wurde, liegt möglicherweise auch an der niedrigen Anzahl von Präparaten, nachdem zahlreiche Präparate – perioperativ bei der

Narkose, wegen schwerer Frakturheilungsstörungen bei mehrfragmentiger Fraktur, aber auch bei der ursprünglich geplanten Färbung mit Safranin-O/Lichtgrün – zerstört wurden.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden deshalb Diskussionen geführt, ob nochmals Tiere nachoperiert werden sollten. Da es um den Vergleich dreier Gruppen mit nicht parametrischen und unabhängigen Werte handelte, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dieser ermöglicht es, eben auch eine kleine Anzahl von Proben zu untersuchen. Diese geht jedoch zu Lasten der Effektstärke. Eine größere Anzahl von Präparaten würde die Werte sicherlich stabilisieren und zu einer besseren Homoskedastizität, also einer geringeren Streuung führen. Hierfür hätte jedoch eine unverhältnismäßig höhere Zahl von Tieren operiert werden müssen. Um die notwendige Anzahl von Versuchen zu ermitteln, wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen.

Im Mann-Whitney-U-Test werden je zwei Untergruppen miteinander verglichen. Hierfür sind Median, Mittelwert und Standardabweichung die relevanten Parameter. Eine geringere Standardabweichung bedeutet eine höhere Homoskedastizität. Es wurden Effektstärke und Power, sowie die jeweils notwendige Gruppengröße ermittelt. Lediglich bei der Kallus- und Kortikalismineralisierung konnte im Mann-Whitney-U-Test eine umsetzbare Gruppengröße für den Vergleich der BIS-Gruppe und der PDLLA-Gruppe gegen die Kontrollgruppe (CTRL) ermittelt werden. Die Gruppengröße von drei Präparaten reicht für eine Power von 0,2, fünf Präparate hätten eine mittlere Power von 0,4 erreichen können. Eine statistische Untersuchung hat bei einem Wert von 0,8 eine hohe Power. Ein Wert von 0,4 steht für eine mittlere, 0,2 für eine geringe Power. In allen anderen Vergleichen ergab sich keine Effektstärke. Diese hätte nur durch eine unverhältnismäßige Vergrößerung der Gruppe erreicht werden können.

Eine hohe statistische Power ist jedoch für die vorliegende Untersuchung nicht zwingend notwendig und auch nicht mit angemessenen Mitteln erreichbar. Es handelt sich in dieser Untersuchung um die erste Evaluation eines Tibianagels mit Medikamentenbeschichtung. Für die erste Stratifizierung ist schon die Aussage wertvoll, dass es zwar keine signifikanten Vorteile, aber - vielleicht noch wichtiger - auch keine nachteiligen Effekte gesehen wurden.

### 9.2 Verhältnis zur biomechanischen Untersuchung

In einem Teilprojekt von Greiner et al. wurde ebenfalls die Wirkung von lokal applizierten Bisphosphonaten (97) aus einer PDLLA-Beschichtung an Sprague-Dawley-Ratten im selben Frakturmodell biomechanisch untersucht und radiologisch beurteilt. Dort konnte gezeigt werden, dass mit Bisphosphonat behandelte Präparate ein signifikant höheres polares Flächenträgheitsmoment und eine höhere radiologisch gemessene zweidimensionale Kallusfläche verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe hatten. Die maximale torsionale Steifigkeit und das maximale Drehmoment waren in der Bisphosphonatgruppe nach sechs Wochen den beiden Kontrollgruppen signifikant überlegen. Nach zwölf Wochen war die Bisphosphonatgruppe den Kontrollgruppen noch signifikant bezüglich der maximalen torsionalen Steifigkeit überlegen, aber nur noch tendenziell hinsichtlich des maximalen Drehmoments.

Mit Bisphosphonat behandelte, frakturierte Rattentibiae weisen tendenziell, und zum Teil signifikant bessere biomechanische Eigenschaften vor; führen jedoch zu keinen signifikanten, nachteiligen Veränderungen der Knochenbeschaffenheit.

### 9.3 Kallusflächen

Die in der histologischen Messung ermittelte Kallusfläche entspricht nicht der radiologisch ermittelten mittleren Kallusfläche. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Kallusfläche berechnete sich als die Fläche in der Sagittalebene und innerhalb der ROI und betrug in etwa  $40 \text{ mm}^2$ , was  $0,4 \text{ cm}^2$  entspricht. Die radiologische Kallusfläche wurde in der Transversalebene aus der maximalen Ausdehnung (Kallusdiameter), in der Sagittal- und der Frontalebene mit Hilfe der Ellipsenformel errechnet und betrug in etwa  $0,14 \text{ cm}^2$ .

In der biomechanischen Arbeit konnten die anhand der Kallusdiameter errechneten mittleren Kallusflächen zu beiden Standzeiten signifikante Werte erreichen. In der histologischen Auswertung wurde hingegen zu keiner Standzeit eine Signifikanz erreicht; in den zwölf-Wochen-Gruppen jedoch wenigstens eine Tendenz ebenfalls zugunsten der mit Bisphosphonat behandelten Präparate. Auch unterscheidet sich der zeitliche Verlauf: In der radiologischen Auswertung hatten alle Gruppen nach vier Wochen die maximale Ausdehnung und der Kallus in der Transversalebene

verkleinerte sich in allen drei respektiven Gruppen bis zur Kontrolle nach zwölf Wochen.

In der histologischen Arbeit hingegen stiegen die Kallusflächen bis zur zwölften Woche in den beiden behandelten Gruppen von unter 40 mm<sup>2</sup> auf gut 50 mm<sup>2</sup>. In der Kontrollgruppe lag der Median der Kallusfläche nach sechs Wochen bei über 40 mm<sup>2</sup> und nach zwölf Wochen bereits wieder darunter.

So scheint es, dass das Kalluswachstum in den unterschiedlichen Schnittebenen einem unterschiedlichen Timing unterliegt. Wilson et al. konnten ebenfalls Unterschiede in der Beschreibung des radiologisch evaluierten Kallus der Schafstibia zeigen (98). Es wurde bereits früher eine um den Defekt konzentrische Ausrichtung beschrieben, aber bisher ist die dreidimensionale Kallusarchitektur noch nicht abschließend verstanden.

Genau deswegen sind weitere Untersuchungen des Knochenstoffwechsels und der Frakturheilung nach wie vor wichtige Forschungsfelder.

## 9.4 Frakturmodell

Grundsätzlich erfordert die wissenschaftliche Untersuchung des Knochenstoffwechsels und der Frakturheilung in Tierversuchen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, Stabilität und Vergleichbarkeit. Ein etabliertes Modell, das diese Kriterien erfüllt, ist das Frakturmodell von Schmidmaier et al. (99). Bei den Frakturmodellen wird zwischen offenen und geschlossenen unterschieden, die bei unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt werden können (100). Bei den offenen Modellen, den Osteotomiemodellen, wird der Knochen initial freipräpariert und im Anschluss der Knochen frakturiert. Hierbei entsteht ein relevanter Weichteilschaden, der einen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung hat. Bei einer geschlossenen Fraktur ist trotz der Gewalteinwirkung von außen der Gewebeschaden kleiner. Zu dem Weichteilschaden, der durch den Druck von der Seite der Krafteinwirkung entsteht, kommt ein weiterer durch das Bersten des Knochens verursachter hinzu. Dennoch führen die geschlossenen Frakturmodelle zu einem kleineren Gewebeschaden als die Osteotomiemodelle (101).

Das hier genutzte Verfahren ist die Weiterentwicklung des 1984 von Bonnarens und Einhorn etablierten, geschlossenen Frakturmodells am Rattenfemur (102). Durch die Modifizierung durch Schmidmaier et al. (103) wurde die Rattentibia, die naturgemäß von weniger Weichgewebe umgeben ist, mit einer atraumatischen Guillotine

(Abbildung 7) frakturiert. Dadurch konnte der perioperative Weichteilschaden als Nebenwirkung der Frakturierung reduziert werden. Das Frakturmodell erlaubt zuverlässig eine nach der AO-Klassifikation geschlossene Fraktur Typ A2/A3 der Rattentibia und Fibula, um eine zusätzliche Frakturstabilisierung zu verhindern (104). So konnte insgesamt eine einheitliche Frakturierung mit einem guten operativen Zugangsweg für die Versorgung mittels Marknagel erreicht werden. Insgesamt resultiert ein geringerer Gewebeschaden als bei der offenen Reposition bei einer Plattenosteosynthese (105).

### 9.5 Versuchstiermodell

Nagetiere sind aufgrund ihrer Haltungsbedingungen und umfangreicher Erfahrungen in der Forschung geeignete Versuchstiere (106), jedoch bleiben die Aussagen in Bezug auf die Übertragbarkeit der aus Rattenversuchen erhobenen Daten auf humanmedizinische Fragestellungen limitiert. Sowohl die hygienischen Bedingungen bei Nagern und deren Auswirkungen auf das Immunsystem der Tiere, als auch das Verhalten der Ratten als vierbeinige Fluchttiere unterscheiden sie vom aufrecht laufenden Menschen; besonders hinsichtlich der frühen Mobilisierung und der Immunreaktionen, die ein wichtiger Motor der Inflammationsphase der sekundären Frakturheilung sind. Wegen der suffizienten Analgesie mit Carprofen blieb eine Schonhaltung des frakturierten Beines aus.

Menschen hingegen werden nach operativ versorgten Extremitätenfrakturen regelhaft postoperativ zu einer Schonung und Minderbelastung angehalten. Eine zu frühe Belastung, aber auch eine zu lange Schonung, können Frakturheilungsveränderungen verursachen, da der Knochen ein mechanosensibles Organ ist (107).

Belastungen des gesunden Knochens regulieren das Remodeling. Die Blutversorgung des Knochens findet im lakuno-kanalikulären System statt. Über das lakuno-kanalikuläre System wird die Beanspruchung erfasst, und das Remodeling im gesunden Knochen angepasst (108).

Ein sehr hoher Fluss im lakuno-kanalikulären System stimuliert die Fibroblasten-Precursorzellen, ein mittlerer Fluss die Chondrofykalisierung des Frakturspaltes, und ein niedriger Fluss – im Inneren der Osteozyten – ermöglicht die Ossifikation (109). Da der Druck und der Fluss im lakuno-kanalikulären System stark von der Belastung abhängig zu sein scheint, ist die Mobilisierung ein entscheidender Faktor für die Frakturheilung. Auch scheint die Mobilisierung an sich besser zu stimulieren (110).

Die bei der Alltagsbelastung entstehenden Mikrocracks der Knochenmikroarchitektur spielen beim Remodeling ebenfalls eine Rolle. (111). Bei den Mikrocracks werden die Havers-Kanäle und die dendritischen Ausläufer der Osteozyten zerrissen und führen somit auch zu einem Abfall des Drucks im lakuno-kanalikulären System. Durch die Zerreißen des Osteozyten wird deren Apoptose initiiert und die Osteoklasten aktiviert; das Remodeling beginnt. Die durch den Druckgradienten entstandene Flussbeschleunigung führt ebenfalls zur Stimulation der Fibroblasten-Precursorzellen. Im Ergebnis führt eine Dynamisierung einer Fraktur über zwei Mechanismen zu einem besseren Remodeling. Inwiefern diese Erkenntnisse auf die Frakturheilung zu übertragen sind, ist offen. Denn ob die Auswirkungen des lakuno-kanalikulären Systems des Geflechtknochens auf den Kallus übertragbar sind, ist ebenso unklar wie die Frage, ob in der frühen Phase der Frakturheilung, in der der Kallus noch relevant knorpelig ist, Mikrocracks eine Rolle spielen. Das sowohl durch den Fluss als auch durch Mikrocracks angestoßene Remodeling beginnt erst nach vier bis zwölf Wochen und somit nachdem der Kallus vollständig mineralisiert ist. Aber es konnte gezeigt werden, dass Mikrotraumata, die durch Bewegung entstehen und Mikrocracks verursachen, die Frakturheilung zu unterstützen scheinen (112), wohingegen eine Einwirkung von zu großen Scherkräften die Frakturheilung in der frühen Phase verzögert (113).

Trotz der möglichen Beeinflussung des Frakturmodells durch die frühe Mobilisierung, wurden die Tiere postoperativ leitliniengerecht einmalig mit Carprofen behandelt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Schmerzmittel unterschiedliche Auswirkungen auf die Wund- und Knochenheilung haben (114). Eine im Juni 2021 veröffentlichte Studie konnte aber negative Einflüsse auf die Knochenheilung nachweisen (115). Eine suffiziente Analgesie ist jedoch essenzieller Bestandteil einer Anästhesie und somit unverzichtbar.

Trotz der Einhaltung von hygienischen Standards traten bei drei Ratten oberflächliche, lokale Wundheilungsstörungen auf. Diese erreichten jedoch radiologisch nie den Knochen und verheilten ausnahmslos ohne Residuen. Es gab zu keiner Zeit Alterationen in den Laborkontrollen (97). Da Infektionen ebenfalls ein wesentlicher Promotor von Frakturheilungsstörungen sind (116), wurden diese Ratten genau inspiziert. Es ergaben sich aber keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich zu den Ratten ohne Wundheilungsstörung. Dennoch besteht das Problem, dass sich die Ergebnisse der Tierversuche nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen

lassen: Neben der fehlenden Immobilisierung unterscheiden sich die Tiere vom Menschen auch im Immunsystem (117).

Auch das Alter der Tiere ist relevant für den Knochenstoffwechsel. Mit drei Monaten sind die Tiere zwar ausgewachsen (118), aber eben noch jung. Da bereits am Operationstag Röntgenbilder angefertigt wurden, konnte zumindest eine Wachstumsfuge in der Tibia und der Fibula ausgeschlossen werden. Da diese Untersuchung sich mit der Frakturheilung beschäftigt, ist das Alter der Ratten hierfür voll ausreichend. Aber die multifaktoriellen Bedingungen, die zum Knochenschwund oder Osteoporose führen, oder gar Frakturheilungsstörungen hervorrufen, sind bis heute nicht abschließend geklärt. Daher wäre die Untersuchung von mit Bisphosphonat beschichteten Kirschnerdrähten an osteoporotischen oder auch einfach nur gealterten Knochen mit reduzierter Aktivität der mesenchymalen Stammzellen sinnvoll (119).

### 9.6 Osteosyntheseverfahren

Die Marknagelung ist der Standard in der Versorgung von Schafffrakturen der langen Röhrenknochen (105). Der Marknagel alleine erzeugt jedoch keine ausreichende Rotationsstabilität (120; 121). In den Dimensionen einer Rattentibia war eine Verriegelung zum Untersuchungszeitpunkt nicht möglich. Deswegen wurden die Beine postoperativ äußerlich mit einem Tapeverband gestützt. Nachdem die Tiere postoperativ die Verbände in den ersten Tagen abgenagt hatten, kam es zwar zu kleineren Rotationsabweichungen, die aber, wie die Erfahrungen aus weiteren Studien der Arbeitsgruppe zeigten, keine weiteren Einschränkungen der Frakturheilung begründeten (122). Histing et al. um Romano Matthys entwickelten einen intramedullären Nagel mit Verriegelungsmöglichkeit. In einer Vergleichsstudie wurden 56 Mausfemorae mit sieben unterschiedlichen Verfahren versorgt. Im Anschluss wurde die Rotationsstabilität mit der von acht unversehrten Femorae verglichen. Keines der Verfahren erreichte die Stabilität der unverletzten Femora. Der Fixateur externe und die Plattenosteosynthese erreichen hierbei die höchste Rotationsstabilität. Die verriegelten intramedullären Verfahren waren hierbei den unverriegelten überlegen (123). Weiterhin bleibt aber ungeklärt, inwiefern die Rotationsstabilität sich überhaupt auf die in dieser Untersuchung beschriebene Kallusqualität auswirkt. Da alle Tiere im selben Verfahren versorgt wurden, wird von einer bestmöglichen Vergleichbarkeit ausgegangen.

## 9.7 Beschichtung

Kirschnerdrähte als Marknägel sind der Standard in der Versorgung kleiner Röhrenknochen, beispielsweise der Mittelhandknochen von Kindern (124). Auch größere Frakturen können mit Kirschnerdrähten stabilisiert oder Fragmente refixiert werden. Hierfür werden in der Regel zur Rotationsstabilität zwei Kirschnerdrähte überkreuz eingebracht (125). Wegen der nochmals kleineren Diaphyse der Rattentibiae war dies anatomisch nicht möglich.

Da operativ keine signifikanten Unterschiede zwischen Titan- und Stahl-Kirschnerdrähten erkennbar sind (126), wurden wegen der besseren Anhafteigenschaften für das PDLLA Titan-Kirschnerdrähte verwandt (127). Für die Beschichtung wurde wegen der guten Verträglichkeit und der hohen mechanischen Stabilität PDLLA verwandt. Polymerisierte Milchsäureketten (Polylaktide = PLA) werden nahezu ubiquitär in der Medizin eingesetzt: als Werkstoff (78; 128; 129), als Substrat für den 3D-Druck (130), aber auch als Werkstoffbeschichtung (131; 132; 133) und Medikamentenbeschichtung zur Retardierung (134; 135; 136).

Dabei ist es selbst vollständig resorbierbar und wird initial durch Hydrolyse in die Milchsäurebestandteile zerlegt und im Laktatzyklus verstoffwechselt (137). Poly-(L)-Laktid (PLLA) verbleibt dabei bis zu zwei Jahre lang im Körper, Poly-(D-L)-Laktid anderthalb Jahre (138). Für C14 markiertes Zoledronat und Wachstumsfaktoren aus PDLLA konnte gezeigt werden, dass diese nach einem initialen Peak in den ersten beiden Tagen nahezu gleichmäßig und bis zu 42 Tagen freigesetzt werden (85; 80). Für PDLLA selbst konnten positive Wirkungen am Knochen nachgewiesen (139) werden, die Gesamtdatenlage ist aber eher heterogen. In einer systemischen Übersichtsarbeit zeigten Annunziata et al. 2017, wie wenige direkte Arbeiten zu PDLLA zu finden sind (140). Die Arbeitsgruppe verglich sechs Arbeiten von Rosen and Reynolds aus 2001 (141), Raghoobar et al. aus 2006 (142), Santana and Mattos aus 2009 (143), Burger B. W. aus 2010 (144), Lie et al. aus 2015 (145) und Göcmen et al. aus 2016 (146). Jede dieser Arbeiten untersuchte PDLLA in unterschiedlichen Applikationsformen und Einsatzgebieten.

Rosen und Reynolds (141) zeigten in ihrer Studie, dass eine flüssige PDLLA Membran eine Implantation im Knochendefekt ermöglichen kann. Verglichen wurde mit gefrorenen Allografts. Die Erfolgsquote lag bei 91%, bei dem einen negativen Ergebnis fand lediglich eine teilweise Überbrückung statt - vermutlich wegen eines zu frühen Verlustes der PDLLA-Barriere im Rahmen eines zu großen Defekts.

Auch Santana und Mattos (143) zeigten, dass eine flüssige PDLLA-Membran keine Nachteile gegenüber dem Standardverfahren hat, dem gefrorenen Allograft.

In der Studie von Raghoobar et al. (142) wurde eine PDLLA-Schraube implantiert. Es bildete sich zwar ein Fibrinfilmm mit Riesenzellen um die PDLLA-Schraube, deren klinische Auswirkung jedoch unklar blieb. Ansonsten gab es zumindest keine negativen Auswirkungen; die Anhafteeigenschaften implizierten gute Implantationserfolge.

Burger B. W. (144) untersuchte PLA Pins und Platten, die zu 50% aus PLLA und zu 50% aus PDLLA bestanden. In dieser Studie ist die Vergleichsgruppe unklar, aber die Autoren postulieren einige Vorteile dieses Systems.

Die Arbeit von Lie et al. (145) war eine prospektive Studie an fünf Menschen mit einer osteodestruktiven Sinusitis, die sich eines beidseitigen Sinuslifts unterzogen. Hierfür wurde eine Seite mit je drei PDLLA Membranen versorgt, die Gegenseite mit auto- und xenogenen Knochentransplantaten. Nach einem Jahr waren weder im Patientenkomfort, noch in der radiologischen Auswertung, noch in der folgenden Zahnimplantatsetzung signifikante Unterschiede zu erkennen.

Göcmen et al. (146) zeigten in ihrer Untersuchung, dass bei Zahnimplantaten mit einem PDLLA-Pin die Knochenstärke der Sinus größer war als auf der Gegenseite, die mit Hyaluron behandelt wurde. Eine Aussage zum Goldstandard, der xeno- und autologen Knochentransplantation, wurde nicht gemacht.

Zum aktuellen Zeitpunkt kann keine konkrete Aussage zur direkten Wirkung von PDLLA auf den Knochen und die Frakturheilung gemacht werden. Aber zumindest können schwerwiegende Auswirkungen auf diese Untersuchung nach derzeitigem Wissenstand ausgeschlossen werden.

## 9.8 Bisphosphonat

Um eine knochenanabole Wirkung auf die Frakturheilung zu erreichen, werden Bisphosphonate eingesetzt. Bisphosphonate liegen initial im Körper frei vor. Sie werden im Körper mit einer hohen Affinität anstelle des Pyrophosphates in das Hydroxylapatit eingebaut. Das Hydroxylapatit wird in den Howship'schen Lakunen hydrolysiert. Die so resorbierten Aminobindungen der im Hydroxylapatit eingebauten Bisphosphonate können jedoch intrazellulär nicht hydrolysiert werden und inhibieren den Mevalonatstoffwechsel im Mitochondrium des Osteoklasten. (147). Darüber hinaus wird das aus Adenosindiphosphat (ADP) gebildete Adenosintriphosphat (ATP)

inaktiviert und steht dem Zellstoffwechsel nicht mehr zur Verfügung (148; 147). Diese beiden Mechanismen führen zu einer Osteoklastenapoptose. Neben der Bisphosphonatwirkung an den Osteoklasten scheint es aber auch eine Wirkung an den Osteoblasten zu geben. Diese scheint dosisabhängig zu sein (149) und sich auch zwischen den einzelnen Bisphosphonatgruppen zu unterscheiden (150). Durch die Osteoblastenaktivierung kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von OPG und einer reduzierten Ausschüttung von RANK-L, was sich beides inhibierend auf die Osteoklastendifferenzierung auswirkt. In der Zusammenschau der Studien hat Zoledronat insgesamt eine überlegene knochenanabole Wirkung: Es inhibiert die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität und erhöht die Osteoblastendifferenzierung und -aktivität.

Damit ein Knochen mechanisch stabil ist, wird nicht nur eine hohe Mineralisierung benötigt, sondern auch eine hohe Elastizität, da er sonst zu spröde ist (151). Dass die Osteoklastenaktivität durch die Bisphosphonattherapie stärker reduziert wird als die Osteoblasten aktiviert werden, scheint ein Grund für eine höhere Mineralisierung zu sein (152). Trotz der so reduzierten Heterogenität des Knochens in der Langzeittherapie mit Bisphosphonaten haben die mit Bisphosphonat behandelten Knochen eine höhere mittlere Dichte und sind widerstandsfähiger gegen Frakturen als osteoporotische Knochen (153).

Dennoch treten bei langjähriger, systemischer Bisphosphonattherapie atypische Frakturen des Femurs auf. Eine Suche bei Pubmed mit den Schlagwörtern „atypical“ und „fracture“ und „bisphosphonate“ ergibt gut 830 Einträge seit 2009 (154). So wird seit 2013 auch über „drug holidays“ nach einer Therapiedauer von 5 Jahren diskutiert (159; 160). Die genauen Ursachen für diese atypischen Frakturen sind jedoch weiterhin ungeklärt. Gerade deswegen liegt der Vorteil der lokal applizierten Bisphosphonate in der Reduzierung oder gar Vermeidung von Nebenwirkungen, die bei systemischer Anwendung auftreten können. So wurden neben den bisphosphonatüblichen Nebenwirkungen wie Kopf- und Gliederschmerzen, gastrointestinalen Beschwerden und den atypischen Frakturen auch nachteilige Effekte auf Knocheninfektionen beobachtet.

Beim wirkstarken Zoledronat tritt als unerwünschte Nebenwirkungen zudem die Nekrose des Gesichtsknochens auf. Hierfür scheinen in erster Linie persistierende Howship'sche Lakunen nach der Osteoklastenapoptose eine Ursache zu sein (155). Wegen dieser weitreichenden negativen Einflüsse der systemischen Bisphosphonattherapie wird an lokalen Anwendungsmöglichkeiten von

Bisphosphonaten geforscht (156-159), denn Bisphosphonaten werden in der Literatur für die lokale Applikation wenig nachteilige, sondern tendenziell positive Effekte auf den Knochenstoffwechsel zugeschrieben (160). Teotia et al. untersuchten in Zement eingebrachtes Zoledronat auf eine Defektheilung. Alle Präparate waren nach zwölf Wochen knöchern überbrückt; mit einer besten Knochenformation in der Zoledronatgruppe (161). Kettenberger et al. mischten Zoledronat in ein Hyalurongel. Das Gel wurde in ein vorgebohrtes Loch im Knochen gegeben und anschließend eine Schraube eingedreht. In den wöchentlichen Micro-CT-Aufnahmen wurde eine deutlich überlegene Anhaftung des Knochens an die Schraube und höhere Knochendichte gemessen (160). Im Verlauf zeigte sich ein Trend, bioaktive Materialien zu kombinieren. So untersuchten Cheng et al. in vitro Zoledronat und BMP aus einem zuckerbasierten Träger und wies auch hier eine überlegene Wirkung nach im Vergleich zu nur appliziertem BMP (156). Auch Murphy et al. untersuchte die Kombination von Zoledronat und BMP aus einem Hydroxylapatitgerüst. Es konnte zumindest eine leichte Überlegenheit gezeigt werden (157).

Neben den Aspekten der Bisphosphonate selbst sollte auch die Freisetzungskinetik berücksichtigt werden. Die Bisphosphonate werden durch ihr „bone targeting“ vorrangig in den Knochen eingebaut. Bei der Freisetzungskinetik aus der PDLLA-Beschichtung ist ein Peak in den ersten zwei Tagen zu erwarten und eine Freisetzung von etwa 70 % des Zoledronats in den ersten sechs Wochen (85; 80). Das freie Bisphosphonat aktiviert auch die Osteoblastenproliferation und -aktivität. Das bedeutet, dass bei der Mineralisierung der Kallusmatrix vermehrt Zoledronat implementiert wird. Dieser Einbau ist der erste Schritt, um im Anschluss in den Osteoklastenmetabolismus einzugreifen.

Das freie Bisphosphonat entfaltet seine direkte Wirkung am Osteoblasten und indirekt am Osteoklasten. Das gebundene Bisphosphonat entfaltet jedoch seine stärkere Wirkung am Osteoklasten nach der Resorption. Diese kommt aber erst nach dem Einsetzen des Remodelings zum Tragen, wenn das im Hydroxylapatit eingebaute Bisphosphonat im Rahmen der Demineralisierung inkorporiert wird. Nach sechs Wochen ist sowohl histologisch als auch radiologisch der Kallus noch mit Knorpel durchwachsen; nach zwölf Wochen ist der Kallus vollständig mineralisiert, jedoch nicht resorbiert. Nach der sonografischen Stadieneinteilung nach Ricciardi (162), die auch der radiologischen Stadieneinteilung zu Grunde liegt (163), ist beim Menschen nach drei Monaten die Mineralisierung des Kallus abgeschlossen. Erst nach diesem

Stadium beginnt die Phase des Kallusremodelings in die ursprüngliche Knochenkonfiguration.

Dass die initiale Wirkung des freien Bisphosphonats am Osteoblasten und dessen indirekte Wirkung am Osteoklasten eine zum Teil signifikant bessere biomechanische Stabilität gewährleisten, konnte von Back et al. gezeigt werden (164). Dadurch jedoch wäre zu mutmaßen, dass histomorphometrisch nach zwölf Wochen erst eine tendenzielle Überlegenheit in der Mineralisierung und Kallusstärke zu ermitteln wären, wenn bei der Resorption des im Hydroxylapatit eingebauten Bisphosphonats die Osteoklasten apoptotisch werden, und die Demineralisierung des Kallus dadurch verzögert wird. Die Ergebnisse von Back et al. zeigen, dass in der Transversalebene der größte Kallusdiameter bereits nach vier Wochen erreicht war. Ab diesem Zeitpunkt setzte sich die Kallusgröße der mit Bisphosphonat therapierten Tibiae durch.

Histologisch waren aber nach sechs Wochen zumindest noch etwa 3% Knorpelanteil in den Kallussen, die nach weiteren sechs Wochen erst voll resorbiert wurden. Ebenfalls konnte gesehen werden, dass nach zwölf Wochen weiterhin ein Kallus persistierte und somit das Remodeling nicht vollständig abgeschlossen war. Auch, dass das Kalluswachstum bis zur zwölften Woche eher zu Gunsten der beiden Kontrollgruppen verlief, könnte ein Hinweis auf die histologisch erst später nachweisbaren Effekte der lokalen Bisphosphonattherapie auf die Frakturheilung sein. Vielleicht würden sich sowohl biomechanische Untersuchungen nach sechs Monaten, als auch histomorphometrische Evaluationen deutlicher in den Gruppen unterscheiden, wenn das eingeschränkte Remodeling weiter fortgeschritten wäre. Zusammengefasst kann vermutet werden, dass die Resorption von durch freie Bisphosphonate unterstützte Mineralisierung durch die Hemmung der Osteoklasten nur schleppend stattfindet.

Ein nicht quantifizierbarer Effekt dieser Untersuchung war der Umstand, dass dreimal mehr Präparate der BIS12-Gruppe bei der Marknagleextraktion zerbarsten als in den beiden anderen Gruppen PDLLA12 und CTRL12. Auch das passt zu der These, dass die einmal durch Bisphosphonat angestoßene Ossifikation ebenfalls durch die implementierten Bisphosphonate nur schwer resorbiert werden können. Nach zwölf Wochen führte die lokale Bisphosphonattherapie zu einer biomechanisch signifikant überlegenen Stabilität. So kann vermutet werden, dass eingewachsene Implantate auch gute Einheilungseigenschaften haben. Denn auch bei anderen Implantatversuchen konnte gezeigt werden, dass nach zwölf Wochen eine bessere

Implantatintegration erfolgte (165-167). Besonders die Arbeiten von Jakobsen et al. weisen in diese Richtung (165; 166).

### 9.9 Ausblick

So scheinen die Einsatzgebiete der Bisphosphonattherapie am Knochen bei Weitem noch nicht ausgereizt zu sein. Diese Untersuchung gibt zumindest Hinweise darauf, dass lokal applizierte Bisphosphonate die biomechanische Belastbarkeit einer Fraktur schneller erhöhen, ohne ihre histologischen Eigenschaften negativ zu verändern. Darüberhinaus fokussieren Bisphosphonate als „bone-targeting-agents“ die Arzneimittelwirkung an Körperstellen mit hohem Knochenstoffwechsel. Diese Funktion wird besonders in der Tumorthherapie als Träger tumortoxischer Substanzen bei Knochenmetastasen angewandt (168; 169). In der lokalen Anwendung wird diese Funktion für die kombinierte Therapie mit dem knochenmorphogenetischen Protein (BMP) 2 und Denosumab genutzt; einem Biosimilar, das die OPG-Wirkung simuliert. Diese Kombinationen zeigten bisher ausgesprochen positive Wirkungen auf die Frakturheilung (170-172).

Um diese reduzierte Knochenheterogenität oder weitere Frakturheilungsstörungen auszuschließen, sollten Langzeituntersuchungen bis zur Restitutio ad Integrum durchgeführt werden. Hierbei könnten auch die negativen Einflüsse der systemischen Therapie wie Osteonekrosen bei persistierenden Howship'schen Lakunen ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben in der Zusammenschau mit der aktuellen Literatur und Forschung im Bereich der Bisphosphonate Anlass, die Untersuchungen fortzusetzen. Insbesondere um positive Wirkungen der lokalen Bisphosphonattherapie nach drei Monaten zu untermauern und negative Wirkungen auf die Frakturheilung weiter auszuschließen. Dahingehend sollten Studien mit längerer Versuchsdauer in Erwägung gezogen werden, um besonders die Einflüsse der in das Hydroxylapatit integrierten Bisphosphonate auf die Osteoklasten besser beurteilen zu können.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. *Acta Orthop.* 2008 Oct;79(5):717-25. doi: 10.1080/17453670810016768.
2. Pressemitteilung Statistisches Bundesamt (Destatis); abgerufen 21.10.21. 8:45 Uhr verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/07/PD21\\_331\\_12621.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/07/PD21_331_12621.html).
3. Rupp M, Walter N, Pfeifer C, Lang S, Kerschbaum M, Krutsch W, Baumann F, Alt V. The Incidence of Fractures Among the Adult Population of Germany – and Analysis From 2009 through 2019. *Dtsch Arztebl Int.* 2021 Oct 8;(Forthcoming):arztebl.m2021.0238. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0238.
4. Bai J, Liang Y, Zhang P, Liang X, He J, Wang J, Wang Y. Association between postoperative delirium and mortality in elderly patients undergoing hip fractures surgery: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2020 Feb;31(2):317-326. doi: 10.1007/s00198-019-05172-7.
5. Xu BY, Yan S, Low LL, Vasawala FF, Low SG. Predictors of poor functional outcomes and mortality in patients with hip fracture: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019 Nov 27;20(1):568. doi: 10.1186/s12891-019-2950-0.
6. Statistisches Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, Schlagwörter: Krankenhauspatienten: Deutschland, Jahre, Geschlecht, Altersgruppen, Hauptdiagnose ICD-10 (1-3-Steller Hierarchie) Jahr 2017, ICD S42,52,62,72,82,92 und Untergruppen, gestorbene Patienten;. abgerufen am 04.07.2020, verfügbar über: <https://www-genesis.destatis.de/genesis//online?operation=table&code=23131-0002&bypass=true&levelindex=1&levelid=1618738334603#abreadcrumb>.
7. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA.* 2009 Feb 4;301(5):513-21. doi: 10.1001/jama.2009.50.
8. Knobe M, Siebert CH. Hüftgelenknahe Frakturen im hohen Lebensalter : Osteosynthese vs. Gelenkersatz [Hip fractures in the elderly : Osteosynthesis versus joint replacement]. *Orthopade.* 2014 Apr;43(4):314-24. German. doi: 10.1007/s00132-014-2265-7.
9. Statistisches Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, Schlagwörter: Krankenhauspatienten: Deutschland, Jahre, Geschlecht, Altersgruppen, Hauptdiagnose ICD-10 (1-3-Steller Hierarchie) Jahr 2017, ICD M84, M86, T84, T86 und Untergruppen, Verweildauer;. abgerufen am 04.07.2020.verfügbar über: <https://www-genesis.destatis.de/genesis//online?operation=table&code=23131-0002&bypass=true&levelindex=1&levelid=1618738334603#abreadcrumb>.
10. Leicht H, Gaertner T, Günster C, Halder AM, Hoffmann R, Jeschke E, Malzahn J, Tempka A, Zacher J. Time to Surgery and Outcome in the Treatment of Proximal Femoral Fractures. *Dtsch Arztebl Int.* 2021 Jul 2;118(26):454-461. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0165.
11. Schiebler. Schiebler T, Korf H, Anatomie; Steinkopf-Verlag. Heidelberg, 2007. S. 156 ff.

12. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):577-87. doi: 10.1136/jcp.2007.048868.
13. Heinrich P, Müller M, Graeve L, Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2014. S 733ff.
14. Chang B, Liu X. Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2021 Mar 8. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0322.
15. Schulte E, Schünke M, Schumacher U. *Prometheus Lernatlas der Anatomie*; Thieme-Verlag. New York, 2011. S. 41.
16. van Tol AF, Roschger A, Repp F, Chen J, Roschger P, Berzlanoviach A, Gruber GM, Fratzl P, Weinkamer R. Network architecture strongly influences the fluid flow pattern through the lacunocanicular network in human osteons. *Biomech Model Mechanobiol*. 2020 Jun;19(3):823-840. doi: 10.1007/s10237-019-01250-1.
17. Gatti V, Azoulay EM, Fritton SP. Microstructural changes associated with osteoporosis negatively affect loading-induced fluid flow around osteocytes in cortical bone. *J Biomech*. 2018 Jan 3;66:127-136. doi: 10.1016/j.jbiomech.2017.11.011.
18. Kurth A, Lange U. *Fachwissen Osteologie*; Elsevier, 2018. S. 4ff.
19. Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):299-306. doi: 10.1007/s00223-012-9672-8.
20. Ren L, Yang P, Wang Z, Zhang J, Ding C, Shang P. Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015 Oct;50:104-22. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.04.021.
21. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*. 2011 Jul-Sep;36(3):209-18. doi:10.1385/1-59259-405-0:395.
22. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80209-3.
23. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 1;291(3):680-6. doi: 10.1006/bbrc.2002.6510.
24. Heinrich P, Müller M, Graeve L, Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2014. S. 956; Abb. 72.2.
25. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R. The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int*. 2013 Jan;110(4):52-7. doi: 10.3238/arztebl.2013.0052.
26. WHO.int. Genf: World Health Organisation, abgerufen am 12.03.2021, verfügbar über <https://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>. Seite 1ff.
27. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:511. doi: 10.3389/fimmu.2014.00511.

28. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:511. doi: 10.3389/fimmu.2014.00511.
29. Silva BC, Bilezikian JP. Skeletal abnormalities in Hypoparathyroidism and in Primary Hyperparathyroidism. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020 Nov 16. doi: 10.1007/s11154-020-09614-0.
30. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol.* 2015 Jun;22:41-50. doi: 10.1016/j.coph.2015.03.005.
31. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2):F157-75. doi: 10.1152/ajprenal.1999.277.2.F157.
32. Heinrich P, Müller M, Graeve L, Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2014. S. 958.
33. Ganten D, Ruckpaul K. *Molekularmedizinische Grundlagen der altersspezifischen Erkrankungen*; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2004. S. 357. .
34. Emmanuelle NE, Marie-Cécile V, Florence T, Jean-François A, Françoise L, Coralie F, Alexia V. Critical Role of Estrogens on Bone Homeostasis in Both Male and Female: From Physiology to Medical Implications. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 4;22(4):1568. doi: 10.3390/ijms22041568.
35. Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, Isidori AM. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Feb;108(3-5):292-9. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.018.
36. Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine.* 2018 Jul;61(1):7-16. doi: 10.1007/s12020-018-1588-2.
37. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011 Jun;42(6):551-5. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
38. Bruch H-P, Trentz O. *Berchtold Chirurgie*, Urban und Fischer, München. 2008. S. 330ff.
39. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol.* 2008 Mar 7;251(1):137-58. doi: 10.1016/j.jtbi.2007.11.008.
40. Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop.* 2017 Dec;4(1):5. doi: 10.1186/s40634-017-0079-3.
41. Roberts JL, Paglia DN, Drissi H. Transcriptional Mechanisms of Secondary Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2018 Apr;16(2):146-154. doi: 10.1007/s11914-018-0429-9.
42. Schulte E, Schünke M, Schumacher U. *Prometheus Lernatlas der Anatomie*; Thieme-Verlag. New York, 2011. S 41. Abb B-10.11.
43. Bruch H-P, Trentz O. *Berchtold Chirurgie*, Urban und Fischer, München. 2008. S 344 ff.
44. Wildemann B, Ignatius A, Leung F, Taitsman LA, Smith RM, Pesántez R, Stoddart MJ, Richards RG, Jupiter JB. Non-union bone fractures. *Nat Rev Dis Primers.* 2021 Aug 5;7(1):57. doi: 10.1038/s41572-021-00289-8.

45. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014 Jun;45 Suppl 2:S3-7. doi: 10.1016/j.injury.2014.04.002.
46. AOfoundation.org. Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen. abgerufen am 23.02.2021. abrufbar über: <https://surgeryreference.aofoundation.org>.
47. Kurth A, Hovy L, Hennigs T. Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen: Tumorosteolysen- Osteoporose. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2001. S. 1ff.
48. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011 Jul;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.
49. Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981;3(4-5):279-87. doi: 10.1016/0221-8747(81)90044-8.
50. Fleisch H, Bonjour JP. Editorial: Diphosphonate treatment in bone disease. *N Engl J Med*. 1973 Dec 27;289(26):1419-20. doi: 10.1056/NEJM197312272892611.
51. Lyles KW, Colón-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L, Moore KA, Lavecchia C, Zhang J, Mesenbrink P, Hodgson PK, Abrams K, Orloff JJ, Horowitz Z, Eriksen EF, Boonen S; HORIZON Recurrent Fracture. Trial. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med*. 2007 Nov 1;357(18):1799-809. doi: 10.1056/NEJMoa074941.
52. Vannala V, Palaian S, Shankar PR. Therapeutic Dimensions of Bisphosphonates: A Clinical Update. *Int J Prev Med*. 2020 Oct 5;11:166. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM\_33\_19.
53. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.
54. Koch FP, Merkel C, Al-Nawas B, Smeets R, Ziebart T, Walter C, Wagner W. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner-a quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and. and. MSX2. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Dec;39(8):562-9. doi: 10.1016/j.jcms.2010.10.007.
55. Hayden RS, Vollrath M, Kaplan DL. Effects of clodronate and alendronate on osteoclast and osteoblast co-cultures on silk-hydroxyapatite films. *Acta Biomater*. 2014 Jan;10(1):486-93. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.028.
56. Wehner C, Lettner S, Moritz A, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Effect of bisphosphonate treatment of titanium surfaces on alkaline phosphatase activity in osteoblasts: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2020 Apr 25;20(1):125. doi: 10.1186/s12903-020-01089-4.
57. Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Effect of bisphosphonates on viability, proliferation, and dexamethasone-induced apoptosis of articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 2002 Oct;61(10):925-8. doi: 10.1136/ard.61.10.925.
58. Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med*. 2010 Jul 9;6:12. doi: 10.1186/1746-160X-6-12.
59. McClung MR. Bisphosphonates in osteoporosis: recent clinical experience. *Expert Opin Pharmacother*. 2000 Jan;1(2):225-38. doi: 10.1517/14656566.1.2.225.

60. MSD.com. Merck, Sharp und Dohme Ltd. abgerufen am 13.04.2021, verfügbar über: [https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/fosamax\\_woch.pdf](https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/fosamax_woch.pdf).
61. Son HJ, Kim JW, Kim SJ. Pharmacoeconomics and clinical characteristics of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2019 Jul 23;41(1):26. doi: 10.1186/s40902-019-0210-8.
62. AWMF.org; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. abgerufen am 11.11.2020. verfügbar über: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/007-091I\\_S3\\_Antiresorptiva-assoziierte-Kiefernekrosen-AR-ONJ\\_2018-12.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-091I_S3_Antiresorptiva-assoziierte-Kiefernekrosen-AR-ONJ_2018-12.pdf).
63. novartis.de; Genf. Novartis AG, abgerufen am 02.04.21, verfügbar über: <https://www.fachinfo.de/pdf/005116>.
64. Aoki K, Matsunaga S, Ito S, Shibahara T, Nomura T, Matsuzaki H, Abe S, Yamaguchi A. Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis. *J Bone Miner Metab*. 2021. *J Bone Miner Metab*. 2021. Apr 8. doi: 10.1007/s00774-021-01223-4.
65. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, Cosman F, Curtis JR, Dell R, Dempster DW, Ebeling PR, Einhorn TA, Genant HK, Geusens P, Klaushofer K, Lane JM, McKiernan F, McKinney R, Ng A, Nieves J, O'Keefe R, Papapoulos S, Howe TS, van der Meulen MC, Weinstein RS, Whyte MP. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*. 2014 Jan;29(1):1-23. doi: 10.1002/jbmr.1998.
66. Lee S, Yin RV, Hirpara H, Lee NC, Lee A, Llanos S, Phung OJ. Increased risk for atypical fractures associated with bisphosphonate use. *Fam Pract*. 2015 Jun;32(3):276-81. doi: 10.1093/fampra/cmu088.
67. Lo JC, Neugebauer RS, Ettinger B, Chandra M, Hui RL, Ott SM, Grimsrud CD, Izano MA. Risk of complete atypical femur fracture with Oral bisphosphonate exposure beyond three years. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020 Dec 3;21(1):801. doi: 10.1186/s12891-020-03672-w.
68. Donnelly E, Meredith DS, Nguyen JT, Gladnick BP, Rebolledo BJ, Shaffer AD, Lorich DG, Lane JM, Boskey AL. Reduced cortical bone compositional heterogeneity with bisphosphonate treatment in postmenopausal women with intertrochanteric and subtrochanteric fractures. *J Bone Miner Res*. 2012 Mar;27(3):672-8. doi: 10.1002/jbmr.560.
69. Jang SP, Yeo I, So SY, Kim K, Moon YW, Park YS, Lim SJ. Atypical Femoral Shaft Fractures in Female Bisphosphonate Users Were Associated with an Increased Anterolateral Femoral Bow and a Thicker Lateral Cortex: A Case-Control Study. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5932496. doi: 10.1155/2017/5932496.
70. Haider IT, Schneider PS, Edwards WB. The Role of Lower-Limb Geometry in the Pathophysiology of Atypical Femoral Fracture. *Curr Osteoporos Rep*. 2019 Oct;17(5):281-290. doi: 10.1007/s11914-019-00525-x.
71. Nishino T, Hyodo K, Matsumoto Y, Yanagisawa Y, Yoshizawa T, Yamazaki M. Surgical results of atypical femoral fractures in long-term bisphosphonate and glucocorticoid users - Relationship between fracture reduction and bone union. *J Orthop*. 2019 Nov 27; 27;19:143-149. doi: 10.1016/j.jor.2019.11.044.

72. Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE, et al. Effects of Continuing or Stopping Alendronate After 5 Years of Treatment: The Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): A Randomized Trial. *JAMA*. 2006;296(24):2927–2938. doi:10.1001/jama.296.24.2927.
73. Hayes KN, Winter EM, Cadarette SM, Burden AM. Duration of Bisphosphonate Drug Holidays in Osteoporosis Patients: A Narrative Review of the Evidence and Considerations for Decision-Making. *J Clin Med*. 2021 Mar 9;10(5):1140. doi: 10.3390/jcm10051140.
74. Zilberman M, Kraitzer A, Grinberg O, Elsner JJ. Drug-eluting medical implants. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(197):299-341. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3\_11.
75. nlm.nih.gov. Bethesda. National Library of Medicine, abgerufen am 27.03.2021, verfügbar über <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
76. Muramatsu N, Yoshida Y, Kondo T. Possible application of polyamine graft copolymer to targeting drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1990 Nov;38(11):3175-6. doi: 10.1248/cpb.38.3175.
77. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty*. 1996 Dec;11(8):939-44. doi: 10.1016/s0883-5403(96)80135-5.
78. Annunziata M, Natri L, Cecoro G, Guida L. The Use of Poly-d,l-lactic Acid (PDLLA) Devices for Bone Augmentation Techniques: A Systematic Review. *Molecules*. 2017 Dec 13;22(12):2214. doi: 10.3390/molecules22122214.
79. Schmidmaier G, Baehr K, Mohr S, Kretschmar M, Beck S, Wildemann B. Biodegradable polylactide membranes for bone defect coverage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Aug;17. (4):439-44. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01242.x.
80. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):449-55. doi: 10.1002/jbm.1040.
81. Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone*. 2002 Jan;30(1):144-51. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00640-8.
82. 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. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Oct;91(1):288-95. doi: 10.1002/jbm.a.32245.
83. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, et al. Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30, 35–42 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00068-004-1322-z>.
84. Fuchs TF, Surke C, Stange R, Quandt S, Wildemann B, Raschke MJ, Schmidmaier G. Local delivery of growth factors using coated suture material. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:109216. doi: 10.1100/2012/109216.
85. Back DA, Pauly S, Rommel L, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B, Greiner SH. Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012 Mar 22;13:42. doi: 10.1186/1471-2474-13-42.

86. Wolfensohn S. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. Wiley Blackwell, New Jersey. 1986.
87. kulzer.de, Hanau, Kulzer heraeus. abgerufen am 31.03.2021, verfügbar über: [https://www.kulzertechnik.com/media/webmedia\\_local/kulzer\\_technique/media\\_4/downloads\\_4/gebrauchsinformationen/GBA\\_Technovit\\_9100.pdf](https://www.kulzertechnik.com/media/webmedia_local/kulzer_technique/media_4/downloads_4/gebrauchsinformationen/GBA_Technovit_9100.pdf) Abgerufen am 31.3.2021 12:39 Uhr.
88. kulzer.de, Hanau, Kulzer heraeus. abgerufen am 31.03.2021, verfügbar über: [https://www.kulzertechnik.de/media/webmedia\\_local/kulzer\\_technique/media\\_4/metall\\_o/downloads\\_5/66062781\\_11TechnovitKunststoffe\\_V2.pdf](https://www.kulzertechnik.de/media/webmedia_local/kulzer_technique/media_4/metall_o/downloads_5/66062781_11TechnovitKunststoffe_V2.pdf) Abgerufen am 31.3.2021 12:48 Uhr.
89. G Lang, Histotechnik, Springer-Verlag Wien-New York, 2006, S 170 ff.
90. G Lang, Histotechnik, Springer-Verlag Wien-New York, 2006, S 45 ff.
91. Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M., & Recker, R. R. (1987). Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2(6), 595-610. doi.org/10.1002/jbmr.5650020617.
92. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2008 Jan;47(1):11-7. PMID: 18210992.
93. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*. 2006 May;37 Suppl 2:S105-12. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.016.
94. Bohnsdorf K, Imhof H, Wörtler K. Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke; Thieme, New York, 2017. S 23ff.
95. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res*. 2005 Oct;20(10):1715-22. doi: 10.1359/JBMR.050702.
96. Greiner S, Kadow-Romacker A, Lübberstedt M, Schmidmaier G, Wildemann B. The effect of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating on osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Mar 15;80(4):769-75. doi: 10.1002/jbm.a.30950. doi: 10.1002/jbm.a.30950.
97. Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. *Acta Orthop*. 2008 Oct;79(5):717-25. doi: 10.1080/17453670810016768.
98. Wilson CJ, Epari DR, Ernst M, Arens D, Zeiter S, Windolf M. Morphology of bony callus growth in healing of a sheep tibial osteotomy. *Injury*. 2021 Jan;52(1):66-70. . doi: 10.1016/j.injury.2020.10.083.
99. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Melis, B. et al. Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30, 35–42 (2004). doi.org/10.1007/s00068-004-1322-z.
100. Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma*. 1999 Feb;13(2):114-20. . doi: 10.1097/00005131-199902000-00008.

101. Decker S, Reifenrath J, Omar M, Krettek C, Müller CW. Non-osteotomy and osteotomy large animal fracture models in orthopedic trauma research. *Orthop Rev (Pavia)*. 2014 Dec 17;6(4):5575. doi: 10.4081/or.2014.5575.
102. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*. 1984;2(1):97-101. . doi: 10.1002/jor.1100020115.
103. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, et al. Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30, 35–42 (2004). doi.org/10.1007/s00068-004-1322-z.
104. Shefelbine SJ, Augat P, Claes L, Beck A. Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model. *J Orthop Res*. 2005 Mar;23(2):489-93. . doi: 10.1016/j.orthres.2004.08.007.
105. Fuchs, S., Wallstabe, S., Gerlach, U. et al. Trauma des Unterschenkels und des oberen Sprunggelenks. *Trauma Berufskrankh* 11, 116–121 (2009). doi.org/10.1007/s10039-008-1447-0.
106. Haffner-Luntzer, M., Kovtun, A., Rapp, A.E. et al. Mouse Models in Bone Fracture Healing Research. *Curr Mol Bio Rep* 2, 101–111 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40610-016-0037-3>.
107. Glatt V, Evans CH, Tetsworth K. A Concert between Biology and Biomechanics: The Influence of the Mechanical Environment on Bone Healing. *Front Physiol*. 2017 Jan 24;7:678. . doi: 10.3389/fphys.2016.00678.
108. van Tol AF, Roschger A, Repp F, Chen J, Roschger P, Berzlanoviach A, Gruber GM, Fratzl P, Weinkamer R. Network architecture strongly influences the fluid flow pattern through the lacunocanicular network in human osteons. *Biomech Model Mechanobiol*. 2020 Jun;19(3):823-840. . doi: 10.1007/s10237-019-01250-1.
109. Lacroix D, Prendergast PJ. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading. *J Biomech*. 2002 Sep;35(9):1163-71. doi: 10.1016/s0021-9290(02)00086-6.
110. Grundnes O, Reikerås O. Mechanical effects of function on bone healing. Nonweight bearing and exercise in osteotomized rats. *Acta Orthop Scand*. 1991 Apr;62(2):163-5. . doi: 10.3109/17453679108999248.
111. Hammond MA, Wallace JM, Allen MR, Siegmund T. Mechanics of linear microcracking in trabecular bone. *J Biomech*. 2019 Jan 23;83:34-42. . doi: 10.1016/j.jbiomech.2018.11.018.
112. Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing--an update. *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S3-10. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.005.
113. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res*. 2003 Nov;21(6):1011-7. . doi: 10.1016/S0736-0266(03)00098-6.
114. Huss MK, Felt SA, Pacharinsak C. Influence of Pain and Analgesia on Orthopedic and Wound-healing Models in Rats and Mice. *Comp Med*. 2019 Dec 1;69(6):535-545. . doi: 10.30802/AALAS-CM-19-000013.
115. Burch MA, Keshishian A, Wittmann C, Nehrbass D, Styger U, Muthukrishnan G, Arens D, Stadelmann VA, Richards RG, Moriarty TF, Thompson K. The non-steroidal anti-inflammatory drug carprofen negatively impacts new bone formation and antibiotic efficacy. in a rat model of orthopaedic-device-related infection. *Eur Cell Mater*. 2021 Jun 17;41:739-755. . doi: 10.22203/eCM.v041a47.

116. Nicholson JA, Makaram N, Simpson A, Keating JF. Fracture nonunion in long bones: A literature review of risk factors and surgical management. *Injury*. 2020 Nov 11;S0020-1383(20)30955-4. . doi: 10.1016/j.injury.2020.11.029.
117. Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D; Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Jan;12(1):60-7. doi: 10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005.
118. Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone*. 1993;14(1):1-6. . doi: 10.1016/8756-3282(93)90248-9.
119. Babenko VA, Silachev DN, Danilina TI, Goryunov KV, Pevzner IB, Zorova LD, Popkov VA, Chernikov VP, Plotnikov EY, Sukhikh GT, Zorov DB. Age-Related Changes in Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2021 May 21;10(6):1273. . doi: 10.3390/cells10061273.
120. Clementz BG. Assessment of tibial torsion and rotational deformity with a new fluoroscopic technique. *Clin Orthop Relat Res*. 1989 Aug;(245):199-209. doi:10.1097/00003086-198908000-00031.
121. Dagnat D., Kempf I. (2002) Biomechanics of Locked Intramedullary Fixation of Fractures. In: Kempf I., Leung K.S., Grosse A., Haarman H.J.T.M., Seidel H., Taglang G. (eds) *Practice of Intramedullary Locked Nails*. Springer, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-642-56330-0\_5.
122. Grundnes O, Reikerås O. Effects of instability on bone healing. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand*. 1993 Feb;64(1):55-8. . doi: 10.3109/17453679308994529.
123. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T. Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res*. 2009 Sep;27(9):1152-6. doi: 10.1002/jor.20849.
124. Prashant K, Lakhota D, Bhattacharyya TD, Mahanta AK, Ravooof A. A comparative study of two percutaneous pinning techniques (lateral vs medial-lateral) for Gartland type III pediatric supracondylar fracture of the humerus. *J Orthop Traumatol*. 2016 . Sep;17(3):223-9. doi: 10.1007/s10195-016-0410-2.
125. Slongo T. Technik und Biomechanik der Bohr-Draht(Kirschner-Draht)-Osteosynthese bei Kindern [Technique and biomechanics of Kirschner wire osteosynthesis in children]. *Oper Orthop Traumatol*. 2020 Dec;32(6):509-529. German. doi: 10.1007/s00064-020-00684-6.
126. Marengo L, Nasto LA, Michelis MB, Boero S. Elastic stable intramedullary nailing (ESIN) in paediatric femur and tibia shaft fractures: Comparison between titanium and stainless steel nails. *Injury*. 2018 Nov;49 Suppl 3:S8-S11. doi: 10.1016/j.injury.2018.09.
127. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):449-55. doi: 10.1002/jbm.1040.
128. Higuchi J, Fortunato G, Woźniak B, Chodara A, Domaschke S, Męczyńska-Wielgosz S, Kruszewski M, Dommann A, Łojkowski W. Polymer Membranes Sonocoated and Electrospayed with Nano-Hydroxyapatite for Periodontal Tissues

- Regeneration. *Nanomaterials* (Basel). 2019 Nov 15;9(11):1625. . doi: 10.3390/nano9111625.
129. Shah Mohammadi M, Rezabeigi E, Bertram J, Marelli B, Gendron R, Nazhat SN, Bureau MN. Poly(D,L-Lactic acid) Composite Foams Containing Phosphate Glass Particles Produced via Solid-State Foaming Using CO<sub>2</sub> for Bone Tissue Engineering Applications. *Polymers* (Basel). 2020 Jan 17;12(1):231. doi: 10.3390/polym12010231.
130. Guerra AJ, Lara-Padilla H, Becker ML, Rodriguez CA, Dean D. Photopolymerizable Resins for 3D-Printing Solid-Cured Tissue Engineered Implants. *Curr Drug Targets*. 2019;20(8):823-838. doi: 10.2174/1389450120666190114122815.
131. Chisari A, Pistritto AM, Piccolo R, La Manna A, Danzi GB. The Ultimaster Biodegradable-Polymer Sirolimus-Eluting Stent: An Updated Review of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 6;17(9):1490. doi: 10.3390/ijms17091490.
132. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*. 2006 May;37 Suppl 2:S105-12. doi: 10.1016/j.injury.2006.04.016.
133. Ginty PJ, Barry JJ, White LJ, Howdle SM, Shakesheff KM. Controlling protein release from scaffolds using polymer blends and composites. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 Jan;68(1):82-9. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.05.023.
134. Bittner B, Morlock M, Koll H, Winter G, Kissel T. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 May;45(3):295-305. . doi: 10.1016/s0939-6411(98)00012-5.
135. Ickowicz DE, Golovanevski L, Haze A, Domb AJ, Weiniger CF. Extended release local anesthetic agents in a postoperative arthritic pain model. *J Pharm Sci*. 2014 Jan;103(1):185-90. doi: 10.1002/jps.23770.
136. Hyon SH. Biodegradable poly (lactic acid) microspheres for drug delivery systems. *Yonsei Med J*. 2000 Dec;41(6):720-34. . doi: 10.3349/ymj.2000.41.6.720.
137. Trapp, S. Biologisch abbaubare Polymere Autor: Wolfram Tänzer. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 12, 167 (2000). doi.org/10.1007/BF03038061.
138. Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Eibach T, Peters C, Baldus SE, Rehm KE. Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *Biomaterials*. 2004 Jan;25(2):259-67. . doi: 10.1016/s0142-9612(03)00496-4.
139. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2008 Jan;47(1):11-7. PMID: 18210992.
140. Annunziata M, Nastri L, Cecoro G, Guida L. The Use of Poly-D,L-lactic Acid (PDLA) Devices for Bone Augmentation Techniques: A Systematic Review. *Molecules*. 2017 Dec 13;22(12):2214. doi: 10.3390/molecules22122214.
141. Rosen PS, Reynolds MA. Guided bone regeneration for dehiscence and fenestration defects on implants using an absorbable polymer barrier. *J Periodontol*. 2001 Feb;72(2):250-6. doi: 10.1902/jop.2001.72.2.250.
142. Raghoobar GM, Liem RS, Bos RR, van der Wal JE, Vissink A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Jun;17(3):288-93. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01200.x.

143. Santana RB, de Mattos CM. Efficacy of vascularized periosteal membranes in providing soft tissue closure at grafted human maxillary extraction sites. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jan-Feb;24(1):81-7. PMID: 19344029.
144. Burger BW. Use of ultrasound-activated resorbable poly-D-L-lactide pins (SonicPins) and foil panels (Resorb-X) for horizontal bone augmentation of the maxillary and mandibular alveolar ridges. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jul;68(7):1656-61. doi: 10.1016/j.joms.2010.02.021.
145. Lie N, Merten HA, Meyns J, Lethaus B, Wiltfang J, Kessler P. Elevation of the maxillary sinus membrane for de-novo bone formation: First results of a prospective study in humans. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 Oct;43(8):1670-7. doi: 10.1016/j.jcms.2015.07.
146. Göçmen G, Atalı O, Aktop S, Sipahi A, Gönül O. Hyaluronic Acid Versus Ultrasonic Resorbable Pin Fixation for Space Maintenance in Non-Grafted Sinus Lifting. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Mar;74(3):497-504. doi: 10.1016/j.joms.2015.10.024.
147. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.
148. Park J, Singh B, Gupta RS. Inhibition of adenosine kinase by phosphonate and bisphosphonate derivatives. *Mol Cell Biochem*. 2006 Feb;283(1-2):11-21. . doi: 10.1007/s11010-006-2216-7.
149. Koch FP, Merkel C, Al-Nawas B, Smeets R, Ziebart T, Walter C, Wagner W. Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner-a quantitative in vitro gene expression analysis of *Dlx5*, *Runx2*, *OCN*, *MSX1* and *MSX2*. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Dec;39(8):562-9. doi: 10.1016/j.jcms.2010.10.007.
150. Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med*. 2010 Jul 9;6:12. doi: 10.1186/1746-160X-6-12.
151. Kurth A, Lange U. *Fachwissen Osteologie*; Elsevier, 2018. S. 5ff.
152. Allen MR. Recent Advances in Understanding Bisphosphonate Effects on Bone Mechanical Properties. *Curr Osteoporos Rep*. 2018 Apr;16(2):198-204. . doi: 10.1007/s11914-018-0430-3.
153. Donnelly E, Meredith DS, Nguyen JT, Gladnick BP, Rebolledo BJ, Shaffer AD, Lorch DG, Lane JM, Boskey AL. Reduced cortical bone compositional heterogeneity with bisphosphonate treatment in postmenopausal women with intertrochanteric and subtrochanteric fractures. *J Bone Miner Res*. 2012 Mar;27(3):672-8. doi: 10.1002/jbmr.560.
154. nlm.nih.gov. Bethesda. National Library of Medicine, abgerufen am 11.4.2021, verfügbar über:  
[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=atypical+fractures+bisphosphonates&sort=pubdate&sort\\_order=asc](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=atypical+fractures+bisphosphonates&sort=pubdate&sort_order=asc).
155. Aoki K, Matsunaga S, Ito S, Shibahara T, Nomura T, Matsuzaki H, Abe S, Yamaguchi A. Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis. *J Bone Miner Metab*. 2021. Apr 8. : s.n. doi: 10.1007/s00774-021-01223-4.

156. Cheng TL, Murphy CM, Ravarian R, Dehghani F, Little DG, Schindeler A. Bisphosphonate-adsorbed ceramic nanoparticles increase bone formation in an injectable carrier for bone tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2015 Oct 22;6:2041731415609448. doi: 10.1177/2041731415609448.
157. Murphy CM, Schindeler A, Gleeson JP, Yu NY, Cantrill LC, Mikulec K, Peacock L, O'Brien FJ, Little DG. A collagen-hydroxyapatite scaffold allows for binding and co-delivery of recombinant bone morphogenetic proteins and bisphosphonates. *Acta Biomater.* 2014. May;10(5):2250-8. doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.016.
158. Tsubouchi Y, Ikeda S, Kataoka M, Tsumura H. Combination therapy with low-dose teriparatide and zoledronate contributes to fracture healing on rat femoral fracture model. *J Orthop Surg Res.* 2018 Oct 25;13(1):267. doi: 10.1186/s13018-018-0917-8.
159. Barbosa JS, Almeida Paz FA, Braga SS. Bisphosphonates, Old Friends of Bones and New Trends in Clinics. *J Med Chem.* 2021 Feb 11;64(3):1260-1282. . doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01292.
160. Kettenberger U, Ston J, Thein E, Procter P, Pioletti DP. Does locally delivered Zoledronate influence peri-implant bone formation? - Spatio-temporal monitoring of bone remodeling in vivo. *Biomaterials.* 2014 Dec;35(37):9995-10006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.09.005.
161. Teotia AK, Gupta A, Raina DB, Lidgren L, Kumar A. Gelatin-Modified Bone Substitute with Bioactive Molecules Enhance Cellular Interactions and Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 May 4;8(17):10775-87. doi: 10.1021/acsami.6b02145.
162. Ricciardi L, Perissinotto A, Dabalà M. External callus development on ultrasound and its mechanical correlation. *Ital J Orthop Traumatol.* 1992;18(2):223-9. PMID: 1289288.
163. Bohnsdorf K, Imhof H, Wörtler K. Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke; Thieme, New York, 2017. S 23ff.
164. Back DA, Pauly S, Rommel L, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B, Greiner SH. Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Mar 22;13:42. doi: 10.1186/1471-2474-13-42.
165. Jakobsen T, Bechtold JE, Søballe K, Jensen T, Greiner S, Vestermark MT, Baas J. Local delivery of zoledronate from a poly (D,L-lactide)-Coating increases fixation of press-fit implants. *J Orthop Res.* 2016 Jan;34(1):65-71. doi: 10.1002/jor.22979.
166. Jakobsen T, Bechtold JE, Søballe K, Jensen T, Vestermark MT, Baas J. Local delivery of zoledronate from a poly (d,l-lactide)-coating increases fixation of hydroxy-coated implants. *J Orthop Res.* 2017 May;35(5):974-979. doi: 10.1002/jor.23219.
167. Shanbhag AS. Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *J Am Acad Orthop Surg.* 2006 Apr;14(4):215-25. . doi: 10.5435/00124635-200604000-00003.
168. D'Oronzo S, Wood S, Brown JE. "The use of bisphosphonates to treat skeletal complications in solid tumours". *Bone.* 2021 Mar 4;147:115907. doi: 10.1016/j.bone.2021.115907.
169. Mollica V, Rizzo A, Rosellini M, Marchetti A, Ricci AD, Cimadamore A, Scarpelli M, Bonucci C, Andriani E, Errani C, Santoni M, Montironi R, Massari F. Bone Targeting

Agents in Patients with Metastatic Prostate Cancer: State of the Art. *Cancers* (Basel). 2021 Feb 1;13(3):546. doi: 10.3390/cancers13030546.

170. Kim HC, Song JM, Kim CJ, Yoon SY, Kim IR, Park BS, Shin SH. Combined effect of bisphosphonate and recombinant human bone morphogenetic protein 2 on bone healing of rat calvarial defects. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2015 Jul 2;37(1):16. doi: 10.1186/s40902-015-0015-3.

171. Klar RM, Duarte R, Dix-Peek T, Dickens C, Ferretti C, Ripamonti U. Calcium ions and osteoclastogenesis initiate the induction of bone formation by coral-derived macroporous constructs. *J Cell Mol Med*. 2013 Nov;17(11):1444-57. . doi: 10.1111/jcmm.12125.

172. Belfrage O, Flivik G, Sundberg M, Kesteris U, Tägil M. Local treatment of cancellous bone grafts with BMP-7 and zoledronate increases both the bone formation rate and bone density: a bone chamber study in rats. *Acta Orthop*. 2011 Apr;82(2):228-33. doi: 10.3109/17453674.2011.566138.

173. Silbernagl S. *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme-Verlag. New York, 1988; S. 142ff.

174. García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariñoso ML, Carbonell J, Mellibovsky L, Nogués X, Ballester J, Aubía J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone*. 1998 Mar;22(3):233-9. doi: 10.1016/s8756-3282(97)00270-6.

175. 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. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Oct;91(1):288-95. doi: 10.1002/jbm.a.32245.

176. Edwards BJ, Bunta AD, Lane J, Odvina C, Rao DS, Raisch DW, McKoy JM, Omar I, Belknap SM, Garg V, Hahr AJ, Samaras AT, Fisher MJ, West DP, Langman CB, Stern PH. Bisphosphonates and nonhealing femoral fractures: analysis of the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) and international safety efforts: a systematic review from the Research on Adverse Drug Events And Reports (RADAR) project. *J Bone Joint Surg Am*. 2013 Feb 20;95(4):297-307. . doi.org/10.2106/JBJS.K.01181.

177. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, Lewiecki EM. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am J Med*. 2013 Jan;126(1):13-20. . doi: 10.1016/j.amjmed.2012.06.023.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mahtala Thiele, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Eine histomorphometrische Evaluation des Einflusses lokal applizierter Bisphosphonate (Zoledronat) auf die Frakturheilung am Rattenmodell – A histomorphometric evaluation of the influence from bisphosphonates (Zoledronic acid) on the fracture healing in a rat-model – selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

---

Datum

Unterschrift

## 12 Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Publikation 1:

Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. Acta Orthop. 2008 Oct;79(5):717-25. doi: 10.1080/17453670810016768. PMID: 18839381.

Beitrag im Einzelnen:

- Geteilte Erstautorenschaft unter Geburtsnamen Alidoust mit Prof. Dr. med. Stefan H. Greiner, Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann, PD Dr. med. David Back, Prof. Dr. med Norbert P. Haas, Prof. Dr. med. Schmidmaier.
- Narkose für die Marknagelimplantation sämtlicher Tiere gemeinsam mit Priv.-Doz. Dr. med. David Back (jeweiliger Eigenanteil: 50 %).
- Wesentlicher Anteil an der Durchführung der Eingangs-, Zwischen und Enduntersuchungen.
- Wesentlicher Anteil an der Aufarbeitung und Auswertung der erhobenen laborchemischen Daten sowie Werte der körperlichen Untersuchung (Gewichtsverlauf und Temperaturverlauf).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## **13 Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde zu datenschutzrechtlichen Zwecken aus der elektronischen Version entfernt.

## 14 Publikationen und Vorträge

### Publikation

Stefan H Greiner, Britt Wildemann, David A Back, Mahtala Alidoust, Philipp Schwabe, Norbert P Haas and Gerhard Schmidmaier Local Application of Zoledronic Acid incorporated in a Poly(D,L-Lactide) coated implant accelerates achievement of biomechanical stability in Fracture Healing in Rats Acta Orthop. 2008 Oct;79(5):717-25. doi: 10.1080/17453670810016768. PMID: 18839381.

### Vorträge

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

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

Greiner S, Wildemann B, Back D, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G

Local Application of Zoledronic Acid incorporated in a Poly(D,L-lactide) coated implant accelerates Fracture Healing in Rats

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

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

Stimulation of fracture healing by local application of a Bisphosphonate

18th European Students´ Conference, Berlin 2007

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

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

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

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

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

3rd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig 2007

## 15 Danksagung

Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda**, dem Leiter des Julius-Wolff-Instituts – damals Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – für die Möglichkeit, die Untersuchungen dort durchführen zu können.

**Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann** und **Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier** danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas

Meinem Doktorvater **Herrn Priv.-Doz. Dr. med. David Back** danke ich für die Übernahme der Betreuung und die hilfreiche Unterstützung beim Erstellen dieser Dissertation.

Weiter danke ich **Herrn Prof. Dr. med. Stefan Greiner** für die Betreuung während der Versuchsphase.

Und nochmals möchte ich **Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann** für Ihre Unterstützung, Motivation, wertvollen Anregungen und Ihre unendlichen Geduld danken.

Ich bedanke mich bei **Frau Dr. med. Camilla Bergmann** für die zahlreichen Hinweise und die viele Zeit, die wir gemeinsam im Labor verbrachten, und dem gesamten **Julius-Wolff-Institut** für die umfangreichen Möglichkeiten, mein Wissen auszubauen und mich dieser Arbeit stellen zu können.

**Herrn Prof. Dr. rer. pol. Max Steinhardt** danke ich für die Vermittlung statistischer Grundlagen, **Frau Dr. rer. nat. Ruth Bartels** für die wertvollen Ratschläge und die Motivation beim Erstellen dieser Arbeit.

Ich danke **Dipl.-Inf. Anne-Grit Fogt** für das Korrektorat und die tatkräftige Unterstützung und grenzenlose Geduld bei der Vermittlung des Wissens für die grafische Umsetzung.

Und **meinem Mann** für seine starken Nerven.

Meiner Mutter in ewiger Dankbarkeit  
1952-2021