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

DISSERTATION

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss eines Statins auf die Heilung der Tibiafraktur

- Eine Studie im Frakturmodell der Ratte -

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Luttosch

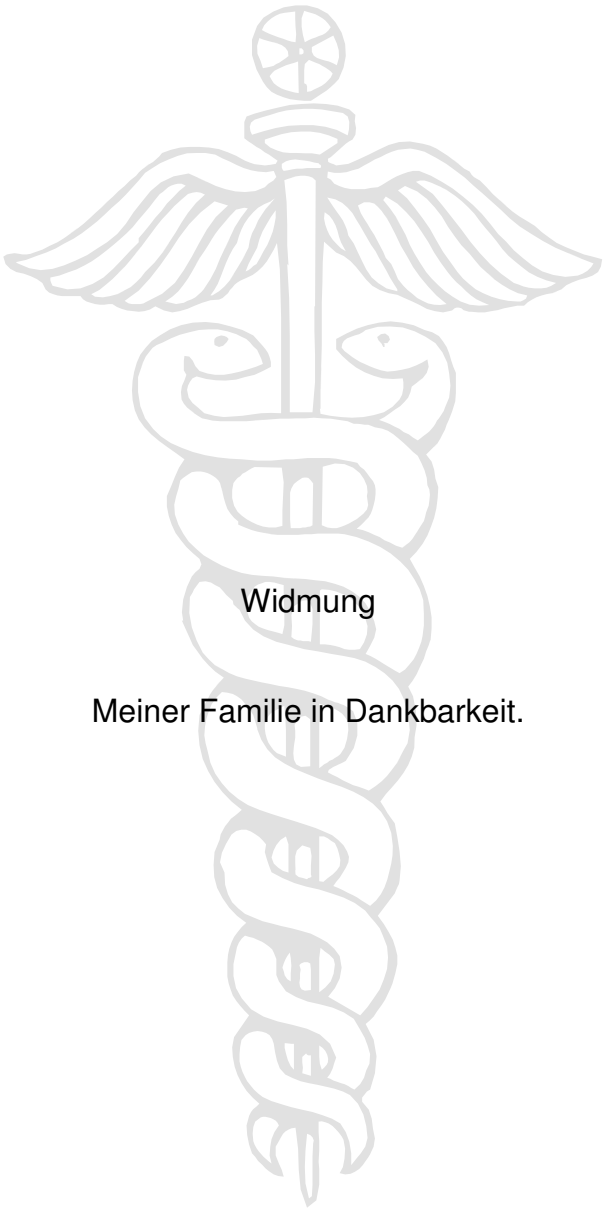
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. rer. nat. B. Wildemann.....

2. Prof. Dr. med. U. Stöckle.....

3. Prof. Dr. med. N. P. Südkamp .....

Datum der Promotion: 16.05.2010 .....



Widmung

Meiner Familie in Dankbarkeit.

Inhalt

1 EINLEITUNG 7

1.1 FRAKTURHEILUNG-GRUNDLAGEN 7

1.2 STÖRUNGEN DER FRAKTUR- UND KNOCHENHEILUNG 9
1.2.1 Epidemiologie 9
1.2.2 Ätiologie 10
1.2.3 Formen 10
1.2.4 Therapieprinzipien 10
1.2.5 Komplikationen 11

1.3 BEEINFLUSSUNG DER HEILUNG 12
1.3.1 Wachstumsfaktoren-Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) 12
1.3.2 Pharmaka zur Beeinflussung der Knochenheilung 15

1.4 DIE GRUPPE DER STATINE 16
1.4.1 Wirkprinzip und Nebenwirkungen 17
1.4.2 Pleiotrope Effekte 18
1.4.3 Statinwirkungen am Knochengewebe 20

1.5 METHODEN ZUR APPLIKATION VON STATINEN 21
1.5.1 Lokal versus systemisch 21
1.5.2 Beschichtung von Osteosynthesematerialien 22

1.6 ZIELSTELLUNG UND HYPOTHESE 23
1.6.1 Zielstellung 23
1.6.2 Hypothese 23

2 MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE IM ÜBERBLICK 24

2.2 STUDIENDESIGN 27
2.2.1 Versuchstiere 28
2.2.2 Frakturmodell 29
2.2.3 Titankirschnerdrähte als Implantate und Beschichtung 30

2.3 ANÄSTHESIE 30

2.4 DER OPERATIVE EINGRIFF 31
2.4.1 Vorarbeiten 31
2.4.2 OP-Technik 31

2.5 UNTERSUCHUNGEN DER VERSUCHSTIERE 33
2.5.1 Postoperative Kontrollen 33
2.5.2 Gewicht- und Temperaturbestimmung 33
2.5.3 Radiologie 33

2.6 TÖTUNG UND PRÄPARATENTNAHME 35

2.7 BIOMECHANIK 36
2.7.1 Einbetten 36
2.7.2 Torsionale Testung mittels Zwick 37
2.7.3 Verarbeitung der gemessenen Daten 38

2.8 HISTOLOGIE 39
2.8.1 Knochenaufbereitung 39
2.8.2 Herstellung der histologischen Schnitte 39
2.8.3 Färben der histologischen Präparate 40
2.8.4 Lichtmikroskopische Beurteilung 42
2.8.5 Histomorphometrische Auswertung mit der Bildanalyse 42

2.9 STATISTIK 44

3 ERGEBNISSE 45

3.1 AUSFÄLLE, OPERATIONSTOLERANZ UND POSTOPERATIVER VERLAUF 45
3.1.1 Ausfälle 45
3.1.2 Operationstoleranz und postoperativer Verlauf 45

3.2 UNTERSUCHUNGEN DER VERSUCHSTIERE 45
3.2.1 Körpergewicht und Körpertemperatur 45
3.2.2 Radiologie 46

3.3 BIOMECHANIK 48
3.3.1 Drehmoment 48
3.3.2 Torsionale Steifigkeit 49

3.4 HISTOLOGIE 51
3.4.1 Histologische Beobachtungen 51
3.4.2 Histomorphometrie 55

4 DISKUSSION 57

4.1 ERGEBNISSE 57

4.2 GEGENÜBERSTELLUNG ZU ANDEREN UNTERSUCHUNGEN 60

4.3 POLY [D,L-LAKTID]-BESCHICHTUNG 64

4.4 TIERMODELL 65

4.5 SIMVASTATIN VERSUS BMP-2 66

4.6 AUSBLICK 68

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 LITERATURVERZEICHNIS 72

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 81

8 TABELLENVERZEICHNIS 83

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 84

10 DANKSAGUNGEN 86

11 LEBENSLAUF 88

12 PUBLIKATIONEN 89

13 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG 90

1 Einleitung

Die Behandlung von Frakturen konnte in den vergangenen Jahren durch moderne Operationstechniken und biomechanisch optimal entwickelte Osteosynthesesysteme fortlaufend verbessert werden. Gleichzeitig unterliegt die Heilung von Frakturen auch heute noch Störungen, die aufwändige Therapien erfordern und für Patienten unterschiedliche Belastungen bedeuten. Aufgrund der anhaltenden immensen gesellschaftlichen Bedeutung von Knochenheilungsstörungen ist es ein vielversprechender Ansatz, herkömmliche Behandlungsmethoden mit heilungsstimulierenden Medikamenten zu verbinden. Mit BMP-2 und BMP-7 stehen für die Behandlung von Knochenheilungsstörungen zurzeit zwei Wachstumsfaktoren mit eingeschränkter Indikation zur Verfügung. Ihr Einsatz ist aber durch hohe Kosten stark limitiert. Daraus leitet sich eine intensive Suche nach einer kosteneffektiven Therapiealternative zu den BMPs ab. Statine, die als cholesterinsenkende Medikamente weltweit klinisch zugelassen sind und sich durch ein geringes Nebenwirkungsspektrum auszeichnen, weisen auch besondere pleiotrope knochenanabole Effekte auf. Die Nutzbarmachung dieser knochenanabolen Effekte deutet eine vielversprechende Alternative zu den bekannten Wachstumsfaktoren für die positive Beeinflussung der Knochenheilung an.

1.1 Frakturheilung-Grundlagen

Die physiologische Heilung von Frakturen unterliegt einem komplex regulierten Prozess, der das koordinierte Zusammenspiel von biologischen und biomechanischen Faktoren erfordert [1]. Die physiologische Heilung von Frakturen kann prinzipiell auf zwei Wegen als primäre oder sekundäre Frakturheilung eintreten. Die sekundäre Frakturheilung erfolgt bei allen spontan heilenden Frakturen und bei Frakturen, die mit nicht stabilen Osteosynthesematerialien versorgt werden. Über einen stadienhaften Verlauf wird zunächst ein bindegewebig-knorpeliges Zwischengewebe, der sog. Kallus, vorgebildet. Der Kallus bildet sich endostal und periostal um die Frakturenden aus, realisiert die für die Heilung notwendige interfragmentäre Stabilisierung und wird erst sekundär in knöchernes Gewebe umgebaut. Bei der sekundären Frakturheilung nimmt die Heilung den nachfolgend skizzierten Verlauf: Durch eine Fraktur wird die strukturelle Integrität des Knochens sowie des Knochenmarks, des Periosts, der Blutgefäße und des umgebenden Weichteilgewebes

zerstört. Die traumatische Schädigung induziert die Ausbildung eines Hämatoms um die Frakturenden (Abb. 1.1) und initiiert inflammatorische Reaktionen mit der Migration von Entzündungszellen und Makrophagen. In das Hämatom sezernierte Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factors-Beta (TGFs-β), Platelet-derived Growth Factors (PDGFs), Insulin-like Growth Factors (IGFs), Vascular-endothelial Growth Factors (VEGFs), Fibroblast Growth Factors (FGFs) und Bone Morphogentic Proteins (BMPs) [2,3] sowie Zytokine unter anderem Interleukin 1 und 6 (IL-1 und IL-6) [4] fördern die Zellinfiltration, Neoangiogenese und die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in unterschiedliche Zelltypen, in bindegewebsbildende Fibroblasten, knorpelbildende Chondroblasten und knochenbildende Osteoblasten. Wenige Tage nach dem Verletzungsereignis setzt die intramembranöse Ossifikation in gewisser Entfernung vom Frakturspalt ein. Sie nimmt ihren Ausgang von mesenchymalen Stammzellen im Bereich des Periosts, die über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten in kompetente knochenbildende Osteoblasten differenzieren. Sie beginnen ohne den Umweg der Knorpelbildung Geflechtknochen, den externen Kallus (External Callus) zu bilden (Abb. 1.2). In der direkten Umgebung des Frakturgebietes setzt die Chondrogenese mit Bildung von hyalinem Knorpelgewebe, dem sog. weichen Kallus (Internal Callus) ein (Abb. 1.2). Knorpelbildende Chondroblasten proliferieren und synthetisieren neue Knorpelmatrix, die anschließend mineralisiert. Im weiteren Verlauf der Heilung wird die überschüssige Knorpelmatrix durch Chondroklasten abgebaut und der weiche Kallus schrittweise durch Anlagerung von Osteoblasten in provisorischen Geflechtknochen, den sog. harten Kallus (Hard Callus) umgebaut (Abb. 1.3). Damit schließt die Heilungsphase der enchondralen Ossifikation ab. In der nachfolgend über ein bis zwei Jahre andauernden Phase des Remodelings erfolgt der Ersatz des Geflechtknochens durch funktionell kompetenten lamellären Knochen und der Abbau von überschüssigem Kallusgewebe durch knochenabbauende Osteoklasten. Im Ergebnis dieser Phase wird die ursprüngliche Struktur des Knochens wiederhergestellt [1,3,5-7] (Abb. 1.4).

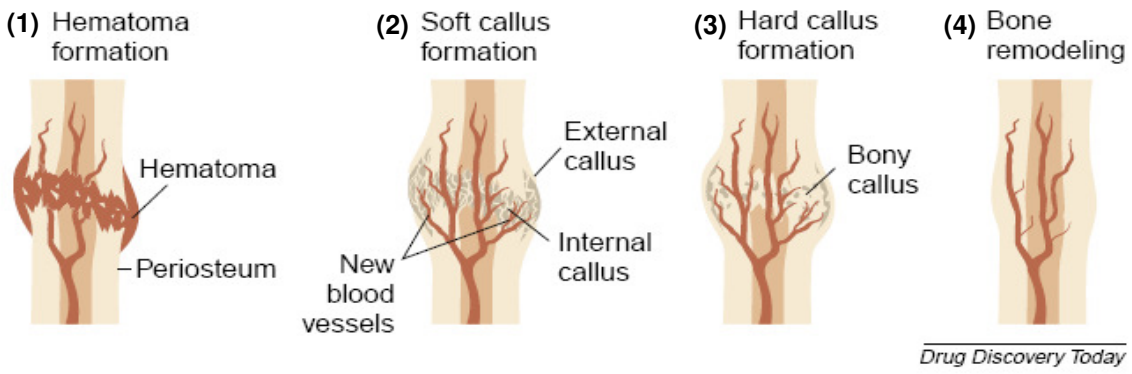


Abb. 1: Stadien der sekundären Frakturheilung (modifiziert nach [3])

Werden Frakturenden durch den Einsatz stabiler Osteosynthesesysteme operativ exakt anatomisch reponiert und unter Kompression gesetzt, verläuft die Heilung ohne den Umweg der Kallusbildung als primäre Frakturheilung. Die Frakturenden werden bei primärer Heilung durch das Havers`sche Remodeling direkt vereinigt. Knochenresorbierende Osteoklasten höhlen Resorptionskanäle aus, welche durch Osteoprogenitorzellen, die aus offenen Haverskanälen stammen und zu Osteoblasten differenzieren, direkt mit lamellärem Knochen aufgefüllt werden [1,5].

1.2 Störungen der Fraktur- und Knochenheilung

1.2.1 Epidemiologie

Abweichend von der physiologischen Heilung von Frakturen treten auch heute noch weltweit in 5 bis 10% aller Frakturen Störungen der Heilung auf [8]. Allein in den Vereinigten Staaten wird eine jährliche Frakturinzidenz von etwa acht Millionen angenommen [9], demnach sind dort 400.000 bis 800.000 Patienten von Störungen der Fraktur- und Knochenheilung betroffen.

Durch die gezielte Entwicklung von verschiedenen Osteosynthesematerialien wie Marknägeln, Schrauben, Platten und Drähten liegt heute eine Vielzahl von Implantatsystemen für unterschiedliche Anforderungen der operativen Frakturbehandlung vor. Mit der Einführung minimal-invasiver Techniken wurden herkömmliche Operationsmethoden zusätzlich optimiert, so dass eine wachsende Anzahl von Frakturen für Patienten weniger belastend zu therapieren ist [10]. Die Gesamtheit der neu eingeführten Behandlungsmethoden konnte aber bisher nicht die Inzidenz von Fraktur- und Knochenheilungsstörungen weiter senken.

Die Fraktur des Unterschenkels stellt mit 40% die häufigste Fraktur der langen Röhrenknochen dar [11]. In einer Untersuchung von Coles et al. wiesen die Autoren

nach, dass das Risiko für eine gestörte Heilung bei der Versorgung der Tibiaschaftfraktur mit einem unaufgebohrten Marknagel mit 16,7% besonders hoch ist [12].

1.2.2 Ätiologie

Ursachen für Störungen der Frakturheilung sind vielfältig und häufig nicht abschließend zu klären. Biologische oder mechanische Faktoren sowie die Kombination beider Faktoren können Störungen der Heilung verursachen. Biologische Faktoren umfassen insbesondere eine nicht ausreichende Vaskularisierung des Frakturgebietes. Heilungsbeeinträchtigende mechanische Faktoren resultieren aus nicht achsengerechter Frakturreposition, aus zu früher postoperativer Belastung oder aus nicht adäquaten Osteosynthesen. Darüber hinaus haben Lokalisation und Komplexität des Traumas sowie Infektionen negative Auswirkungen auf das Heilungsgeschehen. Auch Alter und Geschlecht von Patienten, chronische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder pAVK, Alkohol- und Nikotinabusus sowie bestimmte Medikamente können die Heilung negativ beeinflussen [13,14].

1.2.3 Formen

Die klinischen Ausprägungen einer nicht regelrechten Heilung reichen von einer verzögerten Heilung („Delayed-union“), bei der die Fraktur nach vier bis sechs Monaten nicht konsolidiert, bis zu der Entwicklung einer Pseudarthrose („Non-union“), bei der die Heilung auch nach einem Zeitraum von sechs bis acht Monaten nicht eingetreten ist. Die Klassifikation von Pseudarthrosen erfolgt anhand der Vitalität des regenerativen Gewebes in atrophe und hypertrophe Formen. Während hypertrophe Pseudarthrosen gut vaskularisiert und daher kallusreich sind und meist durch mechanische Faktoren entstehen, liegt atrophen Pseudarthrosen möglicherweise eine schwere Perfusionsstörung zugrunde. Bei zusätzlichen Infektionen liegen infizierte Pseudarthrosen vor, bei parallelem Vorhandensein von knöchernen Defekten sog. Defektpseudarthrosen [14].

1.2.4 Therapieprinzipien

Bei hypertrophen Pseudarthrosen ist der Wechsel des Osteosynthesesystems meist ausreichend, um die gestörte mechanische Stabilität wiederherzustellen und somit die Heilung zu gewährleisten. Bei atrophen und insbesondere bei infizierten Pseudarthrosen gestaltet sich die Therapie weitaus schwieriger. Es ist ein auf-

wändiges therapeutisches Vorgehen notwendig. In mehreren Eingriffen müssen beispielsweise Verfahrenswechsel, radikale Infektsanierung, intermediäre Stabilisierung mittels Fixateur externe, plastische Weichteilrekonstruktionen, Knochensanierung durch Spongiosaplastik und Ausgleich der Längendifferenzen mittels Kallusdistraktion nach Ilizarov erfolgen [14].

1.2.5 Komplikationen

Aus der Notwendigkeit häufig komplexer operativer Interventionen ergeben sich für Patienten immense Belastungen. Wiederholte operative Eingriffe sind immer mit allgemeinen Risiken wie Verletzungen von Gefäßen und Nerven verbunden. Es besteht ein hohes Infektionsrisiko mit der Gefahr von Wundheilungsstörungen, und insbesondere Patienten mit Frakturen der Tibia sind durch ernste Komplikationen wie der Entwicklung eines Kompartmentsyndroms, einer Osteomyelitis oder Fettembolien gefährdet [12]. Zudem besteht im postoperativen Verlauf das Risiko der Entstehung einer tiefen Beinvenenthrombose mit dem erhöhten Risiko einer Lungenembolie [12,15]. Nicht zuletzt sind bestimmte Verfahren mit spezifischen Problemen verbunden. Die Entnahme von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm zur Defektfüllung macht einen zusätzlichen Eingriff notwendig, das Material steht nur eingeschränkt zur Verfügung, und der Eingriff kann mit ernsthaften Komplikationen wie der Herniation von abdominellen Organen und Frakturen der Beckenkammregion assoziiert sein [16]. Bei Einsatz eines Fixateur externe kann es zur Pin-Lockerung oder Pin-Infektion kommen [14]. Die Technik nach Ilizarov führt insbesondere im Sprung- und Kniegelenk zu persistierenden Schmerzen und hat das Risiko der Entwicklung einer Sprunggelenksarthrose [17].

Für Patienten sind Knochenheilungsstörungen regelmäßig mit schmerzhaften Bewegungseinschränkungen verbunden. Es drohen Deformierung und Gelenkeinsteifung, was für die Betroffenen hohe physische und psychische Belastungen bedeutet [14]. Im Extremfall drohen der Verlust des Arbeitsplatzes und/oder die Berentung. Neben den individuellen Belastungen entstehen durch Knochen- und Frakturheilungsstörungen hohe gesellschaftliche Kosten für die operativen Eingriffe, die krankheitsbedingten Arbeitsausfälle sowie die hohen Nachsorgeaufwendungen für die oft langwierige Rehabilitation der Patienten.

1.3 Beeinflussung der Heilung

Frakturheilungsstörungen erfordern nicht selten ein komplexes operatives Regime, hinzu kommen oft zusätzliche Komplikationen. Deshalb hat die traumatologisch-orthopädische Forschung die wichtige Aufgabe, neue Behandlungsmethoden zur effektiven Beeinflussung der Knochenheilung zu entwickeln. Das fortschreitende Verständnis der Physiologie der Frakturheilung führte in den vergangenen Jahren zu dem Konzept, die natürlich an der Regulation der Frakturheilung beteiligten Wachstumsfaktoren als heilungsstimulierende Medikamente zu gewinnen und diese in die etablierten Behandlungsmethoden der Frakturversorgung einzubeziehen. Durch die exogene Applikation von Wachstumsfaktoren sollte die Frakturheilung auf zellulärer Ebene stimuliert und dadurch die Heilung verkürzt und insgesamt verbessert werden. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Stimulation der Fraktur- und Knochenheilung unter Applikation der Wachstumsfaktoren IGF und TGF [18], FGF [19], VEGF [20] und BMPs [21,22] haben das heilungsstimulierende Potenzial dieser Substanzen nachgewiesen. Zwei Vertreter der BMPs haben bereits den Weg in den klinischen Alltag gefunden, werden aber aufgrund der hohen Kosten nur zurückhaltend eingesetzt. Daher versuchen die neuesten Entwicklungen in der Forschung, pleiotrope Effekte von gut etablierten Medikamenten für die Knochenregeneration nutzbar zu machen. Eine vielversprechende Substanzgruppe sind die Statine, da von Mundy et al. gezeigt wurde, dass diese die endogene BMP-Produktion bei Osteoblasten stimulieren [23].

1.3.1 Wachstumsfaktoren-Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

Unter den bisher bekannten Wachstumsfaktoren nehmen die BMPs eine Schlüsselstellung in der Frakturheilung ein. Während der verschiedenen Phasen der Heilung werden die BMPs lokal im Frakturgebiet exprimiert und regulieren die Heilungsprozesse der intramembranösen und der enchondralen Ossifikation, indem sie die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu chondrozytären und osteoblastären Zellen stimulieren [2,24].

Das natürliche Reservoir der BMPs stellt das Knochengewebe dar, was erstmals von Urist entdeckt wurde. Durch Implantation von entkalkter Knochenmatrix gelang es, eine ektope Knochenbildung in extraskelettalen Geweben bei Ratten zu induzieren [25]. Diese Entdeckung führte Urist zu dem Schluss, dass im Knochengewebe Substanzen vorhanden sind, die die de novo-Synthese von Knochenge-

webe stimulieren. Diese Substanzen wurden später als Proteine identifiziert und sind nach Aufklärung ihrer genetischen Sequenz heute als rekombinante BMPs für die klinische Anwendung verfügbar [26].

Bisher wurden mehr als 16 verschiedene BMPs beschrieben, die nach Strukturhomologien in weitere Subgruppen unterteilt werden. Ausgenommen von BMP-1 gehören die BMPs zur Wachstumsfaktorenfamilie der Transforming Growth Factors-Beta (TGFs-β) [27] (Abb. 2).

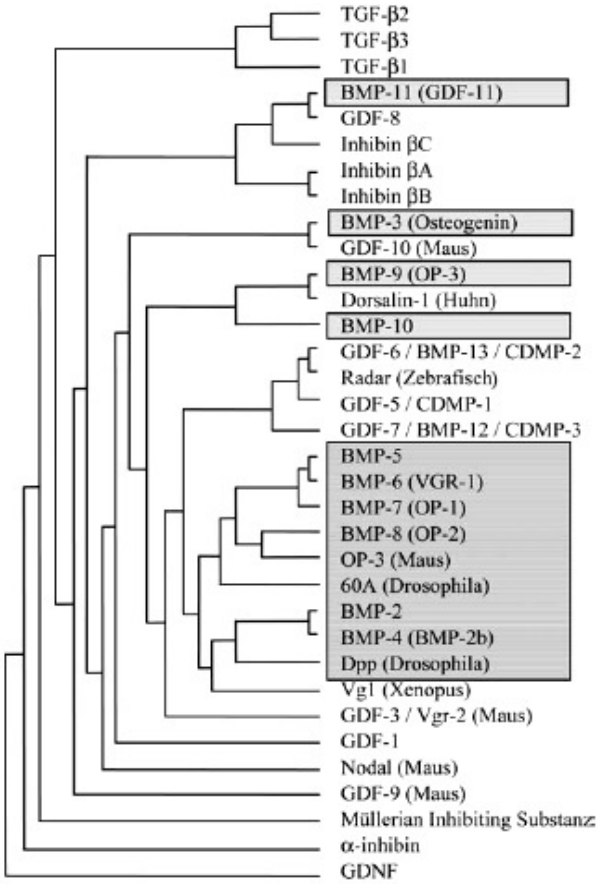


Abb. 2: Mitglieder der TGF-β-Superfamilie [28]
Auswahl der bekannten BMPs mit synonym gebrauchten Bezeichnungen

Obwohl BMPs ursprünglich im Knochengewebe entdeckt wurden und ihnen deshalb primär eine chondro- und osteoinduktive Wirkung beigemessen wurde, liegen heute Ergebnisse verschiedener experimenteller Studien vor, welche die BMPs als wichtige Regulatoren für die Pränatalentwicklung verschiedenster Organsysteme ausweisen. Untersuchungen an Knockout-Mäusen zeigten, dass eine Defizienz an BMP-7 Anomalien der Nieren und des Auges induzierte [29]. Das Ausschalten von BMP-2 bei Mäusen war letal und verursachte kardiale Entwicklungsstörungen [30], während eine gestörte Expression von BMP-4 Störungen der embryonalen Lun-

genentwicklung zur Folge hatte [31]. Daneben scheinen die BMPs auch in die regelrechte Organogenese des Gastrointestinaltrakts involviert zu sein [32].

BMP-2 und BMP-7

Unter allen BMPs haben BMP-2 und BMP-7 nachweislich das höchste osteoanabole Potenzial. In vitro-Experimente zeigten eine stimulierende Wirkung von BMP-2 auf die Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen in osteoblastäre Zellen [33], die Expression von spezifischen Markern der Osteoblastendifferenzierung [34] und die Chemotaxis durch die Migration von humanen Osteoblasten [35].
In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde untersucht, ob BMP-2 exogen appliziert die Fraktur- und Knochenheilung stimulieren kann. Die Ergebnisse dieser Studien wiesen nach, dass BMP-2 ein hohes heilungsstimulierendes Potenzial aufweist [21,22,36]. Deshalb folgte im Jahr 2002 die große prospektiv klinische BESTT-Studie an 450 Patienten mit offenen Tibiaschaftfrakturen. In dieser Studie wurden die Patienten zu drei Gruppen randomisiert. Die Patienten der ersten Gruppe erhielten die Standardtherapie mit Marknagelung und Weichteilmanagement, die Patienten der zweiten Gruppe zusätzlich ein Implantat mit 0,75 mg/ml rhBMP-2 und die Patienten der dritten Gruppe ein Implantat mit 1,50 mg/ml rhBMP-2. Die Patienten der Gruppe mit der höheren BMP-2-Dosierung zeigten nach 12 Monaten eine signifikante Reduktion von Revisionseingriffen, weniger Infektionen, eine verbesserte Wundheilung und eine signifikant beschleunigte Frakturheilung [37]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist BMP-2 unter dem Präparatnamen Dibotermin alfa (InductOs) bereits zur Therapie von Fraktur- und Knochenheilungsstörungen und bei bestimmten Eingriffen in der Wirbelsäulenchirurgie beim Menschen zugelassen. Auch BMP-7 hat als Eptotermin alfa (Osigraft) eine klinische Zulassung für die Behandlung von Tibiapseudarthrosen. Da die BMPs schnell in vivo metabolisiert werden, müssen sie in ein Trägermaterial eingearbeitet werden [9]. Das für die BMPs zurzeit zugelassene Trägermaterial ist Rinderkollagen. Die klinische Anwendung von BMP-2 und BMP-7 wird aber durch sehr hohe Kosten limitiert. Bei einmaliger Anwendung von BMP-2 in Rinderkollagen entstehen Kosten in Höhe von 3.713,43 € [38], bei Anwendung von BMP-7 Kosten in Höhe von 5.402,72 € [39]. Neben diesen hohen Kosten ist das Nebenwirkungsspektrum der BMPs noch nicht abschließend geklärt. Deshalb sind BMP-2 und BMP-7

bei Kindern und Frauen in der Gravidität sowie bei vorbestehenden Tumorerkrankungen kontraindiziert.

1.3.2 Pharmaka zur Beeinflussung der Knochenheilung

Aufgrund der hohen Kosten der BMPs wäre die Entwicklung neuer heilungsstimulierender Substanzen wünschenswert. Diese sollten sich durch ein vertretbares Nebenwirkungsprofil, eine variable Applizierbarkeit, eine einfache Herstellung und einen akzeptablen Kostenaufwand auszeichnen. Aktuell werden unter anderem für diese Anforderungen Statine und Bisphosphonate erprobt.

Bisphosphonate sind Medikamente, die zur Therapie der Osteoporose und zur Therapie von Knochenerkrankungen mit gesteigertem Knochenumbau wie dem Morbus Paget sowie tumorassoziierten Knochenveränderungen eingesetzt werden [40]. Die Hauptwirkung der Bisphosphonate besteht in der Inhibition der osteoklastären Knochenresorption durch direkte Wirkung der Bisphosphonate auf die knochenabbauenden Osteoklasten. Bisphosphonate binden mit hoher Affinität an das mineralisierte Knochengewebe, insbesondere in Zonen, die einem erhöhten resorptiven Umbau unterworfen sind [41]. Die Bisphosphonat vermittelten Wirkungen an Osteoklasten bestehen wahrscheinlich in einer direkten Induktion der Apoptose [42,43]. Bisphosphonate der dritten Generation, sog. N-BPs („Nitrogen containing bisphosphonates“ - stickstofftragende Bisphosphonate), sollen antiresorptive Wirkungen durch einen Eingriff in den zellulären Mevalonatweg vermitteln, wo sie die Farnesyldiphosphatsynthetase inhibieren [44,45]. Über eine nachfolgend unterbundene Proteinprenylierung soll dies in der Inhibition der osteoklastären Knochenresorption resultieren [46-48] (Abb. 3). In jüngeren tierexperimentellen Untersuchungen mit Bisphosphonaten konnte zudem gezeigt werden, dass sie die Osteointegration von Implantaten förderten [49] und die Frakturheilung positiv beeinflussten [50]. Zur effektiven Beeinflussung der Frakturheilung wäre aber eine Substanz wünschenswert, die durch knochenanabole Eigenschaften die Knochenneubildung stimuliert und damit die Frakturheilung fördert. Dieser Anforderung scheinen die Statine zu entsprechen. Analog den Bisphosphonaten greifen Statine in den Mevalonatweg ein, aber weiter upstream (Abb. 3). Über einen bisher nicht abschließend geklärten Mechanismus induziert dies eine vermehrte Expression des Wachstumsfaktors BMP-2 und eine gesteigerte osteoblastäre Knochenneubildung [23]. Analog den Bisphosphonaten scheint hierbei die unterbunde-

ne Proteinprenylierung eine wichtige Rolle zu spielen. Obgleich Bisphosphonate und Statine auf verschiedenen Ebenen in den Mevalonatweg eingreifen, wurde ein BMP-2 stimulierender Effekt bisher ausschließlich für Statine nachgewiesen, während es unter dem Einfluss von Bisphosphonaten zu keiner gesteigerten BMP-Produktion kommt.

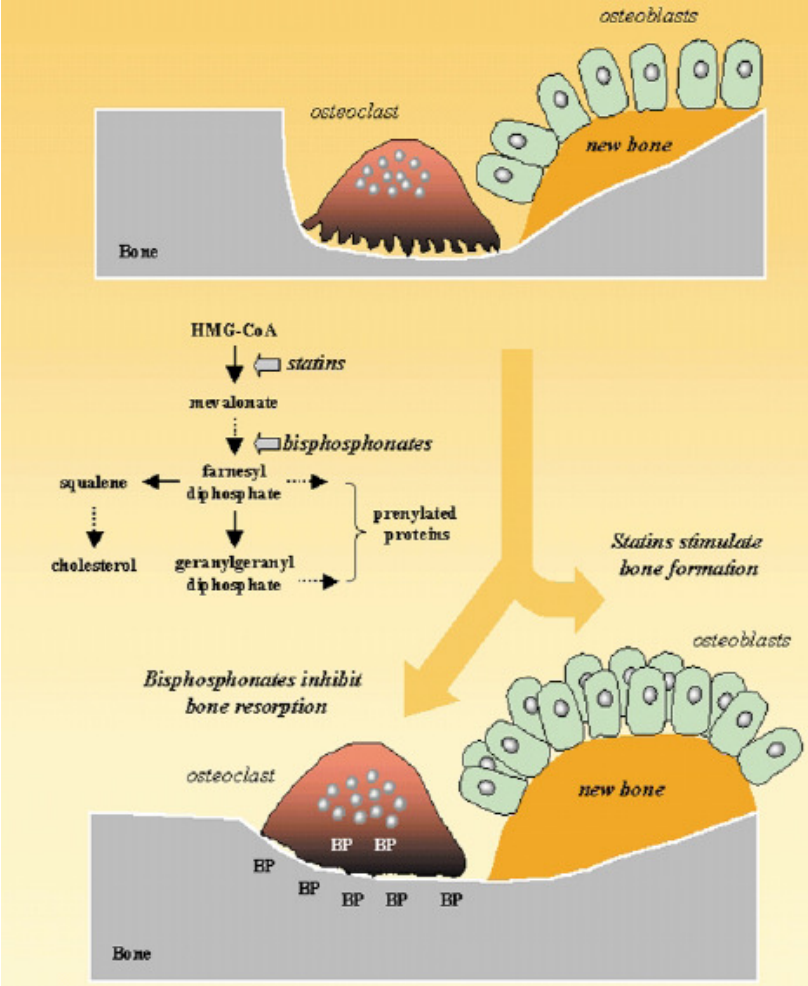


Abb. 3: ***Verschiedene Interaktionen von Statinen und Bisphosphonaten im Mevalonatweg*** [51]
Über eine Inhibition der Farnesyldiphosphatsynthetase inhibieren Bisphosphonate (BP) die osteoklastäre Knochenresorption, während Statine durch eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat unterbinden und eine vermehrte osteoblastäre Knochenneubildung induzieren.

1.4 Die Gruppe der Statine

Die Statine sind eine Stoffgruppe von Medikamenten, deren gemeinsame Hauptwirkung in der Absenkung des Serum-Cholesterins, insbesondere an LDL-(Low-Density-Lipoprotein)-Cholesterin besteht. Allein in Deutschland wurde im Jahr 2007 ein Verordnungsvolumen an Statinen erreicht, das die Behandlung von

5,7 Millionen Patienten mit Standarddosierungen ermöglichte, wobei Simvastatin das am häufigsten verschriebene Statin war [52].

Entdeckt wurden die Statine in den 70er Jahren von dem Japaner Akira Endo, der das erste Statin Mevastatin (Compactin) aus dem Pilz Penicillium citrinum isolierte [53]. 1980 wurde das Statin Lovastatin (Mevilonin) aus dem Pilz Aspergillus tereus gewonnen [54], und 1987 wurde Lovastatin zur Senkung von erhöhtem Cholesterin in den USA erstmals zugelassen [55]. Heute sind die Statine neben der Indikation zur Therapie der Hypercholesterinämie fest in die Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingebunden, die häufig durch Atherosklerose entstehen. Der Atherosklerose liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, und ein erhöhtes LDL-Cholesterin ist nachweislich in die Pathogenese der Atherosklerose involviert [56]. Der therapeutische Nutzen von Statinen zur Prävention und Verlangsamung der Progression von kardiovaskulären Erkrankungen durch Absenkung des LDL-Cholesterins wurde in verschiedenen großen klinischen Studien wie der 4S- [57], der WOSCOPS- [58], der LIPID- [59] und der Heart-Protection-Studie [60] wiederholt belegt. In der 1994 veröffentlichten placebokontrollierten 4S-Studie wurde beschrieben, dass Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und erhöhtem LDL-Cholesterin, die täglich Simvastatin einnahmen, nach fünf Jahren eine Reduktion des Gesamtcholesterin um 25%, des LDL-Cholesterin um 35% und eine Erhöhung des HDL-Cholesterin um 8% sowie eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität aufwiesen [57].

1.4.1 Wirkprinzip und Nebenwirkungen

Statine unterbrechen die endogene Cholesterinbiosynthese. Sie wirken primär in der Leberzelle und unterliegen daher nach oraler Einnahme einer hohen präsystemischen Elimination (First-pass-Effekt) [61].

Im Hepatozyten inhibieren die Statine das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase, das die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat katalysiert (Abb. 4). Durch die Statin vermittelte Inhibition der HMG-CoA-Reduktase wird die Cholesterinbiosynthese unterbrochen. Im Ergebnis sinkt der intrazelluläre Cholesterolgehalt, wodurch über einen Feedback-Mechanismus vermehrt LDL-Rezeptoren exprimiert werden. Über die LDL-Rezeptoren erfolgt eine gesteigerte Cholesterolaufnahme aus dem Blut,

so dass der Cholesterolspiegel im Blut fällt und der endogene Cholesterol-Pool konstant bleibt [62] (Abb. 4).

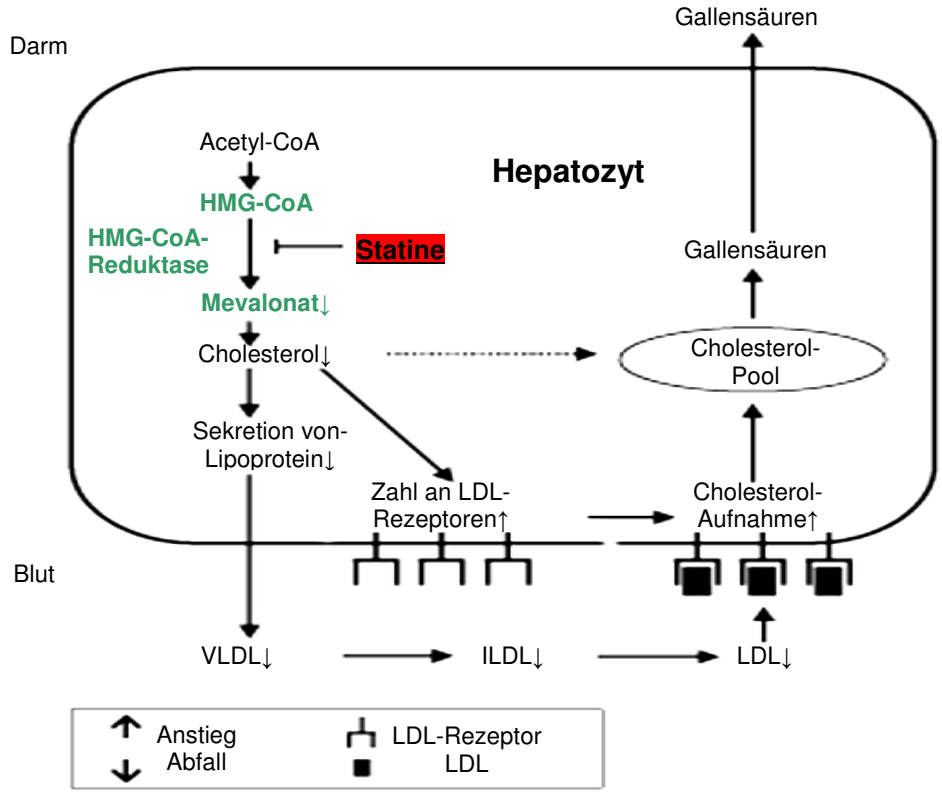


Abb. 4: Wirkungsmechanismus der Statine im Hepatozyten (modifiziert nach [63])

Statine werden grundsätzlich gut vertragen. Zu den seltenen Nebenwirkungen zählen gastrointestinale Beschwerden, Hepatotoxität mit Transaminasenanstieg und Myalgien mit Anstieg der Kreatinkinase bis zur Rhabdomyolyse mit Nierenversagen [61,64].

1.4.2 Pleiotrope Effekte

Die positive Beeinflussung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Stabilisierung der Atherosklerose wurde über mehrere Jahre auf die LDL senkende Wirkung der Statine reduziert. Ergebnisse aus klinischen und experimentellen Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass die Statine zusätzliche, sog. pleiotrope Effekte entfalten. Landmesser et al. verabreichten Patienten entweder 10 mg/d Simvastatin oder den Cholesterinabsorptionsinhibitor Ezetimib. Nach vier Wochen stellten sie eine verbesserte Endothelfunktion der mit Simvastatin behandelten Patienten fest. Simvastatin und Ezetimib führten zu einer äquivalenten Reduktion an LDL-Cholesterin, aber unter Ezetimib blieb die Endothelfunktion unbeeinflusst [65]. Auch Ergebnisse anderer Untersuchungen legen die Entfaltung pleiotroper Effekte

unter Statinen nahe. Als Beitrag zur positiven Beeinflussung von atherosklerotisch veränderten Gefäßen wurden plaquestabilisierende [66] und antiinflammatorische [67] Wirkungen der Statine beschrieben. Die pleiotropen Effekte scheinen auch über die Beeinflussung der Atherosklerose hinauszugehen. Aufgrund möglicher immunmodulatorischer, neuroprotektiver und immunsuppressiver Wirkungen werden Statine auch in der Behandlung der Multiplen Sklerose [68], der Alzheimer Demenz [69] und der Rheumatoiden Arthritis [70] diskutiert. Neben diesen Effekten werden auch die gesteigerte endogene Expression von BMP-2 und die vermehrte osteoblastäre Knochenneubildung den pleiotropen Statinwirkungen zugewiesen. Nach gegenwärtiger Auffassung resultieren die BMP-2 stimulierende Wirkung und andere pleiotrope Effekte aus dem Eingriff der Statine in den Mevalonatweg. Im Mevalonatweg werden auf dem Syntheseweg zum Cholesterin Zwischenprodukte, die sog. Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), gebildet (Abb. 5). Im Rahmen posttranskriptionaler Modifikationen prenylieren FPPs und GGPPs verschiedene Signalmoleküle wie die GTP bindenden Proteine Rho und Rac, deren Funktion von diesem Vorgang abhängig ist [63,71]. Für die vermehrte Produktion von BMP-2 unter dem Einfluss von Statinen scheint die Inhibition von Rho bedeutsam zu sein [72] (Abb. 5).

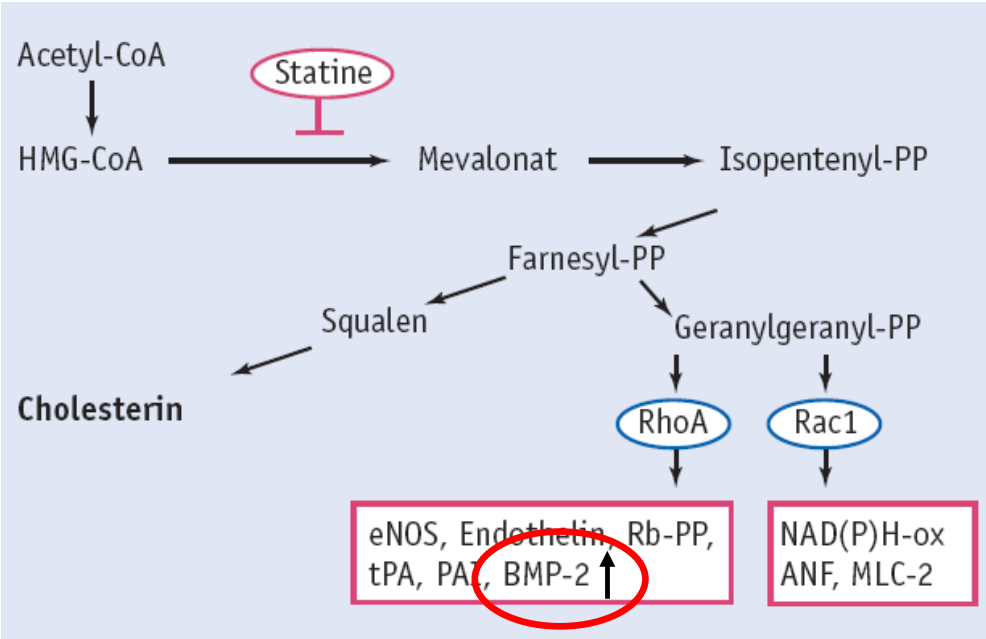


Abb. 5: ***Möglicher Mechanismaus der gesteigerten BMP-2-Produktion unter Statinen über eine Inhibition von Zwischenprodukten des Mevalonatwegs (modifiziert nach [71])***

1.4.3 Statinwirkungen am Knochengewebe

Dass Statine die Produktion von BMP-2 stimulieren und eine gesteigerte osteoblastäre Knochenneubildung induzieren, wurde erstmals 1999 von Mundy et al. beschrieben [23]. Hintergrund dieser Entdeckung war die Suche nach einem knochenanabolen Osteoporosepräparat. Die medikamentöse Therapie der Osteoporose war mit Ausnahme von Parathormon auf antiresorptive Substanzen wie Bisphosphonate, Östrogene, selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren, Calcitonin und Vitamin D-Analoga beschränkt. Diese Medikamente verlangsamten den pathologischen Knochensubstanzverlust bei Osteoporose, aber bauten kein Knochengewebe de novo auf [73].

Im Wissen um die knochenanabolen Wirkungen des Wachstumsfaktors BMP-2 testeten Mundy et al. mehr als 30.000 Substanzen hinsichtlich der Stimulierbarkeit des BMP-2-Promoters. Unerwartet wurde unter der Vielzahl von geprüften Substanzen nur das Statin Lovastatin identifiziert und eine BMP stimulierende Wirkung nachfolgend auch für Simvastatin und weitere Statine bestätigt. In humanen und murinen Osteoblasten wurde die vermehrte Expression von BMP-2 mRNA, nicht aber von BMP-4 mRNA unter dem Einfluss von Statinen nachgewiesen. Demnach war die Statin vermittelte BMP-2-Stimulation spezifisch. In Knochenzellen aus der Schädelkalotte von Mäusen induzierten Simvastatin und andere Statine eine Erhöhung der Osteoblastenzahl und eine gesteigerte Knochenneubildung. Darüber hinaus führte subkutan injiziertes Simvastatin zu einer nahezu 50%igen Erhöhung der Knochenneubildung und systemisch oral verabreichtes Simvastatin zu einem signifikant gesteigerten trabekulären Knochenvolumen bei Ratten. Da der BMP-2 stimulierende Effekt durch die Zugabe von Mevalonat aufgehoben wurde, wurde gefolgert, dass die Statin vermittelte Inhibition der HMG-CoA-Reduktase Grundlage der gesteigerten BMP-Stimulierung sein muss [23].

Seit dieser Entdeckung wurde die Wirkung von Statinen auf das Knochengewebe intensiv untersucht. Verschiedene in vitro-Untersuchungen bestätigten die Beobachtung, dass Statine eine vermehrte Expression von BMP-2 in osteoblastären Vorläuferzelllinien und in Osteoblasten stimulieren und die Differenzierung von Osteoblasten fördern [72,74,75].

Der knochenanabole Effekt der Statine durch eine Stimulierung der endogenen BMP-2-Synthese macht die Statine zu einem idealen Kandidaten in der Osteoporosetherapie und -prävention. Da Statine von Millionen Patienten täglich oral ein-

genommen werden, haben verschiedene Autoren untersucht, ob diese Patienten neben der gewünschten Wirkung auch hinsichtlich einer gesteigerten Knochendichte oder eines reduzierten Frakturrisikos als Ausdruck knochenanaboler Statineffekte profitieren. In einer Studie wurde bei Patientinnen, die täglich Simvastatin einnahmen, nach zwei Jahren ein signifikanter Anstieg der Knochendichte im Bereich der Lendenwirbelsäule und der Hüfte festgestellt [76]. In einer anderen Studie führte die Einnahme von Statinen zu einer signifikant erhöhten Knochendichte im Bereich des Femurs [77]. Auch eine große Metaanalyse aus dem Jahr 2007 wies eine signifikant gesteigerte Knochendichte im Bereich der Hüfte bei Patienten unter Statintherapie nach [78]. Bezüglich eines Einflusses von Statinen auf das Frakturrisiko wurde in einer Studie ein um 71% reduziertes Risiko von Frakturen der Hüfte bei Patienten unter Statinmedikation festgestellt [79]. Vergleichbar positive Wirkungen wurden auch von anderen Autoren mit Risikoreduktionen zwischen 36% [80], 50% [81] und 60% [82] beschrieben. Neben diesen Studien konnten andere Studien keinen Einfluss von Statinen auf die Knochendichte oder das Frakturrisiko bei Patienten nachweisen [83-86].

Waren die Ergebnisse klinischer Studien bisher nicht immer einheitlich, so konnten doch verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen knochenanabole Wirkungen von Statinen wiederholt nachweisen [87-89]. In diesen Studien wurden die Statine nicht oral verabreicht, sondern alternativ transdermal oder lokal appliziert. Unter transdermaler Applikation von Lovastatin war die Knochenneubildung bei Ratten um 150% gesteigert [87]. Zudem legen Ergebnisse bisheriger tierexperimenteller Untersuchungen nahe, dass sich die knochenanabole Wirkung der Statine womöglich auch für die Knochenregeneration zur Verbesserung der Heilung nutzen lässt [88,89]. Simvastatin induzierte, lokal im Knochendefekt appliziert, eine gesteigerte Knochenneubildung um 308% [89]. Die Ergebnisse weiterer Studien mit Statinen zeigten, dass Statine bei lokaler Applikation auch die Heilung von Frakturen positiv beeinflussen können [90-92].

1.5 Methoden zur Applikation von Statinen

1.5.1 Lokal versus systemisch

Um die knochenanabolen Effekte der Statine für die Frakturheilung nutzbar zu machen, können die Statine systemisch oder lokal appliziert werden. Die nicht

immer einheitlichen Ergebnisse der klinischen Studien [76-86] legen nahe, dass sich die systemische Applikation von Statinen zur Beeinflussung der Frakturheilung weniger eignet. Statine sind cholesterinsenkende Medikamente und ihr primärer Wirkort ist die Leber. Sie zeichnen sich durch einen ausgeprägten First-pass-Effekt aus, so dass nur sehr geringe extrahepatische Konzentrationen erreicht werden [61]. Deshalb erscheint es für eine mögliche Anwendung von Statinen in der Frakturheilung zweckmäßig, sie direkt lokal am Knochengewebe zu applizieren.

1.5.2 Beschichtung von Osteosynthesematerialien

Um die Statine lokal zu applizieren, wurden in der Vergangenheit Injektionstechniken [23,90,91] und Minipumpen [92] erprobt. Diese Verfahren erfordern aber zusätzliche Eingriffe. Demgegenüber stellt die Verwendung eines Trägermaterials in Kombination mit einer Osteosynsthese eine besonders patientenfreundliche Methode dar. Die Methode der Beschichtung von Osteosynthesesystemen wurde erstmals von Schmidmaier et al. im Jahr 2001 vorgestellt. Schmidmaier et al. entwickelten ein Trägermaterial auf der Basis von Poly[D,L-Laktid] (PDLLA), welches die Möglichkeit eröffnet, verschiedene Wirksubstanzen in frei wählbaren Dosierungen einzuarbeiten [93]. Integriert in Poly[D,L-Laktid] werden die Wirksubstanzen auf die zu implantierenden Osteosynthesesysteme aufgetragen und von diesen direkt an der Fraktur freigesetzt. Damit genügt ein operativer Eingriff, um die Fraktur zu versorgen und gleichzeitig die heilungsstimulierende Substanz zu verabreichen. Durch den Einsatz eines Trägermaterials ergibt sich zudem der wichtige Vorteil, dass die eingearbeiteten Substanzen durch das Trägermaterial vor unkontrollierter frakturferner Freisetzung geschützt werden, was potenzielle systemische Nebenwirkungen reduziert.

Die Effektivität der von Schmidmaier et al. entwickelten Beschichtungstechnik konnte bisher in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen mit BMP-2 [21], anderen Wachstumsfaktoren [18] und Bisphosphonaten [50] nachgewiesen werden und könnte sich somit auch als eine Applikationsmethode für die Statine herausstellen.

1.6 Zielstellung und Hypothese

1.6.1 Zielstellung

In einem standardisierten Frakturmodell der Ratte [94] soll der Einfluss eines Statins, Simvastatin, auf die Heilung der Tibiafraktur unter lokaler Applikation von Poly[D,L-Laktid] beschichteten Kirschnerdrähten nach einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen untersucht werden. Um mögliche dosisabhängige Wirkungen zu prüfen, wird das Statin Simvastatin in zwei verschiedenen Dosierungen erprobt. Zudem erfolgt ein Vergleich des Einflusses von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur mit einer unbeeinflussten Heilung sowie mit einer durch den knochenanabolen Wachstumsfaktor BMP-2 stimulierten Heilung. Es werden sowohl radiologische, biomechanische als auch histologische und histomorphometrische Methoden angewandt.

1.6.2 Hypothese

Das Statin Simvastatin hat bei lokaler Applikation von PDLLA beschichteten Kirschnerdrähten einen dosisabhängig stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur bei Ratten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte im Überblick

- **Titankirschnerdrähte als Implantate und Beschichtung**

Implantate: Titankirschnerdrähte (Ti-6Al-4V)(Ø 1,0 mm) (Synthes, Bochum, Dtl.)

Beschichtung: Poly[D,L-Laktid], Resomer 203 (Boehringer Ingelheim, Dtl.)

Wirksubstanzen: Simvastatin* und rekombinant humanes BMP-2 (Osteogenetics, Würzburg, Dtl.)

* Die Simvastatin beschichteten Nägel wurden von Frau Dr. Milvia Lepre, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

- **Anästhesie**

Medikamente: Forene (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether) (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Dtl.), Ursotamin (Ketaminhydrochlorid) (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Dtl.), Rompun 2% (Xylacinhydrochlorid) (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Dtl.)

Sonstiges: Einmalspritzen 1 ml (BD Plastipak™3, Becton Dickinson SA, Madrid, Spanien) und Kanülen steril 24G (BD Microlance™3, Drogheda, Irland), Einmalmundschutz (Farstar, Hamburg, Dtl.) und Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson, New Brunswick Intl., USA),

- **Der operative Eingriff**

Operationsbesteck: Kirschnerdrähte aus Stahl (Ø 0,8 und Ø 1,0 mm), Präparierschere, Pinzette anatomisch und chirurgisch, Nadelhalter, Kneifzange, Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd., Medical Division, Osaka, Japan)

Geräte: Frakturmaschine (Eigenentwicklung), Röntgenbogen Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Dtl.), Elektorasierer Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Dtl.), Digitalthermometer (Paul Hartmann LTD, Heywood, UK), Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106 (Sartorius, Göttingen, Dtl.)

Sonstiges: Mundschutz und Einmalhaube (Farstar, Hamburg, Dtl.), sterile Einmalhandschuhe (Gammex PF Ansell UK Ltd., Tamworth, Staffordshire, UK), sterile Tischabdeckung (Foliodrape Hartmann AG, Heidenheim, Dtl.), Präpariertupfer RK (Lohmann und Rauscher, Dtl.), Mulltupfer Röko-steril 20 x 20 cm (Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen, Dtl.), Hautfäden nichtresorbierbar Prolene 4-0 (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Dtl.), Leukoplast (Beiersdorf AG, Hamburg, Dtl.), Sprühpflaster Band-Aid™ (Ethicon GmbH, Norderstedt, Dtl.), Enthaa-

rungscreme Pilca (Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Dtl.), Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Dtl.), Gleitmittel Xylocain Gel 2% (Astra GmbH, Wedel, Dtl.), Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, USA), Softasept Desinfektionsspray (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.) und verschiedenfarbige Filzstifte (Edding AG, Ahrensburg Dtl.)

- **Radiologie**

Geräte und Materialien: Röntgengerät Mobilett Plus (Siemens AG, München, Dtl.), Röntgenplatten: Fuji IP Cassette 3A, 24 x 30 cm (Fuji Photo Film Co., LTD, Japan), Röntgenschürzen und Röntgenzahlen, Leukosilk-Pflaster (Beiersdorf, Hamburg, Dtl.)

- **Tötung und Präparatentnahme**

Medikamente: Forene, Ursotamin und Rompun, Kaliumchorid 14,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.)

Geräte: Lüer, Fasszange, Präparierschere, Pinzette, Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division)

Sonstiges: Kanülen steril 24G (BD Microlance™3, Drogheda, Irland), Einmalspritzen 5 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.), Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, USA), Mullkompressen 10 x 10 cm 8fach, BEESANA (Karl Beese GmbH & Co. KG, Bursbüttel, Dtl.) Mundschutz

- **Biomechanik**

Materialien: Flüssigkeit Technovit 3040 und Pulver Technovit (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Dtl.), Pappbecher, Rührspatel und Einmalspritzen 10 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.), Einmalmundschutz (Farstar, Hamburg, Dtl.) und Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson, New Brunswick Intl., USA), Leukosilk-Pflaster (Beiersdorf AG, Hamburg, Dtl.), Isotone Natriumchloridlösung Plastipur (Fresenius, Bad Homburg, Dtl.)

Geräte: Ständer mit drei rotierbaren Ebenen, Gussformen 3 x 3 x 2,5 cm; Innendurchmesser 1,1 x 1,1 x 1,5 cm, Visierhilfe, Winkel DIN 875/1 (ORION, Dtl.) Messschieber, Transportklemme, Torsionsmaschine (Eigenentwurf), Materialprüfmaschine Zwick (Zwick, Ulm, Dtl.), Messkraftverstärker Typ MCG (HBM, Darmstadt, Dtl.), Computer mit Software Catman 32 (HBM, Darmstadt, Dtl.), Software Excel (Microsoft, USA), Drucker

- **Histologie**

Materialien: Platikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette, Quantity 125 (Sakura, USA), Fixierlösung (324 ml Formaldehyd (37%), 550 ml Alkohol (100%), 130 ml Barbital-Na-Puffer (0,1 molar, pH 7,3), 6 g Glukose), Alkohol (70, 80, 96, 100%), Xylol Merck KgaA (Darmstadt, Dtl.), Technovit 9100 neu (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Dtl.), Schneideflüssigkeit (WIV, Schwetzingen, Dtl.), Streckflüssigkeit (30 ml Butoxyethyl-Acetat, 70 ml Alkohol 70%)

Geräte: Schüttler HS 501 digital (KIKA Labortechnik), Einbettformen, Pinsel und Pinzette fein, Objektträger HistoBond 75 x 25 x 1 mm (Paul Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Dtl.), Filterpapier 58 x 58cm, Kisol-Folie 0,025 x 95 x 95 mm (Medim Histotechnologie GmbH, Gießen, Dtl.), Schleifscheiben Discs WS-Flex 18-C SK 250 mm P60 (Hermes, Walter Messner GmbH, Oststeinbek/Hamburg, Dtl.), Handschleifgerät Phoenix 3000 (Jean Wirtz Laborgeräte Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Dtl.), Mikrotom SM 2500S (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Dtl.), Schneidemesser Hartmetall (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Dtl.), Wärmeschrank Function line Typ B12 (Heraeus Instruments Kendro Laboratory Products, Hanau, Dtl.)

Färbelösungen: 2-Methoxyethyl-Acetat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Dtl.), Alkohol (70, 80, 96, 100%), Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.), 3%ige Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), Natriumkarbonatformaldehydlösung (Merck, KgaA, Darmstadt, Dtl.), 5% Natriumthiosulfatlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), 1%ige wässrige Methylgrünlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), Pikrofuchsinlösung van Gieson (Division Chroma, Münster, Dtl.), Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, Dtl.), Vitroclud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Dtl.)

Sonstiges: Bildanalyseprogramm Zeiss KS 400, Mikroskop DM R (Leica Mikroskope&Systeme GmbH, Wetzlar, Dtl.), Objektiv mit Vergrößerung 1,6 mm, Kamera AxioCam MRc5 Carl Zeiss

2.2 Studiendesign

Für die Untersuchung des Einflusses des Statins Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur wurde Ratten im Rahmen eines standardisierten Frakturmodells eine Querfraktur der Tibiadiaphyse und Fibula induziert. In Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit wurden die Tibiafrakturen mit beschichteten oder unbeschichteten Titankirschnerdrähten versorgt. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere zu den nachfolgend aufgeführten fünf Gruppen I bis V randomisiert:

Den Tieren der Gruppe I, die als Negativkontrollgruppe diente, wurde ein unbeschichteter Kirschnerdraht implantiert. In der PDLLA-Gruppe II wurden nur PDLLA beschichtete Implantate eingesetzt. Die Gruppen III und IV waren die Behandlungsgruppen und wurden mit verschieden konzentrierten Simvastatin beschichteten K-Drähten stabilisiert. Die Tiere der Gruppe V bildeten die Positivkontrollgruppe und wurden mit BMP-2 beschichteten Kirschnerdrähten versorgt (Tab. 1).

Tab. 1: Gruppeneinteilung

Gruppe:	**I**	**II**	**III**	**IV**	**V**
Implantat:	Kirschnerdraht (Negativ-kontroll-gruppe)	Kirschnerdraht +PDLLA (PDLLA-Gruppe)	Kirschnerdraht +PDLLA +Simvastatin low dose (Behandlungs-gruppe)	Kirschnerdraht +PDLLA +Simvastatin high dose (Behandlungs-gruppe)	Kirschnerdraht +PDLLA +BMP-2 (Positiv-kontroll-gruppe)
Dosierung:			3 µg	50 µg	50 µg
Anzahl:	20	20	20	20	20

Für das Versuchsvorhaben wurden vier Untersuchungszeitpunkte festgelegt:

Am Tag 0 erfolgte die operative Frakturinduktion und an den Tagen sieben und 14 Verlaufsuntersuchungen. Nach 28 Tagen wurden die Tiere der Tötung zugeführt und im Anschluss biomechanische sowie histomorphologische und histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten wurden die Körpertemperatur und das Gewicht der Tiere bestimmt sowie Röntgenbilder in konventioneller Technik angefertigt (Abb. 6).

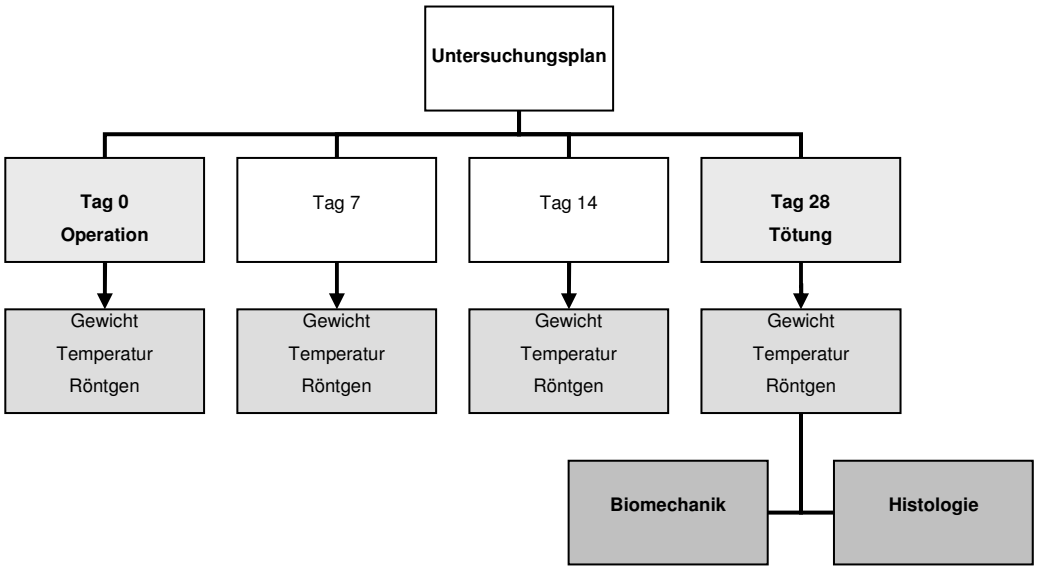


Abb. 6: Untersuchungsplan

Analog dem vorliegenden Studiendesign führte Herr Dr. med. Moritz Morawski im Rahmen seiner Dissertation radiologische, biomechanische und histologische Untersuchungen 42 Tage post operationem durch.

Das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin hat das Versuchsvorhaben unter der Nummer G0147-06 genehmigt.

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten fünf bis sechs Monate alte weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 240 bis 250 g (Harlan Winkelmann GmbH Borchen, Dtl.). Die Haltung der Ratten sowie alle Operationen und Untersuchungen erfolgten in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin. Die Tiere wurden in Typ IV-Käfigen zu je fünf Tieren bei einem Tag-Nacht-Wechsel von zweimal 12 Stunden gehalten. Bei einer Luftfeuchte von 55-60% betrug die Umgebungstemperatur konstant 22°C. Den Ratten stand Futter (Sniff Ratten/Mäuse-Haltung, Spezialdiäten GmbH Soest, Dtl.) und Wasser jederzeit frei zugänglich zur Verfügung. Vor Beginn der Versuche verblieben die Ratten mindestens drei Tage in den Käfigen, um langsam an die veränderten Bedingungen zu adaptieren.

2.2.2 Frakturmodell

Um den Einfluss des Statins Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur zu untersuchen, wurde das von Schmidmaier et al. etablierte Frakturmodell angewandt [94]. Im Rahmen dieses Modells wird die Rattentibia durch die eigenentwickelte Frakturmaschine standardisiert frakturiert (Abb. 7). Die Frakturmaschine basiert auf dem Funktionsprinzip der Dreipunktbiegung und induziert geschlossene Querfrakturen der Tibiadiaphyse und Fibula gemäß der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO 42-A1/2/3).

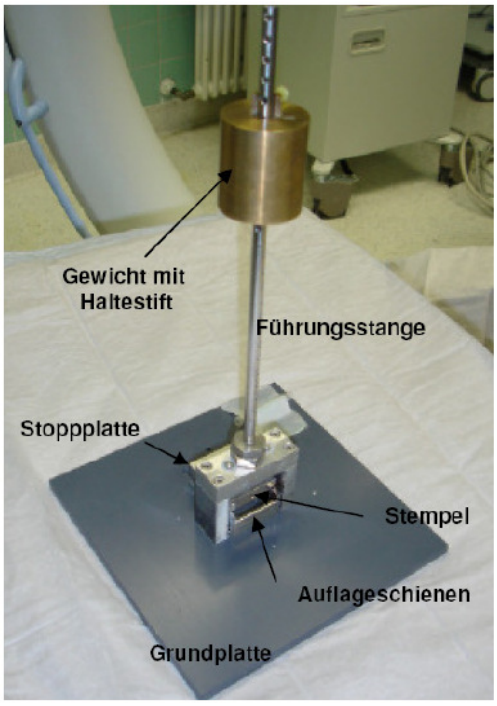


Abb. 7: Aufbau der Frakturmaschine (modifiziert nach [94])

Zur Induktion der Fraktur wurde das narkotisierte Tier mit dem nach außen rotierten rechten Hinterlauf in die Frakturmaschine gelegt. Das Bein wurde auf zwei Auflageschienen positioniert und anschließend über eine frei einstellbare Stoppplatte sicher in der Frakturmaschine fixiert. Dann wurde ein Stempel auf das Bein gesetzt, der den Hinterlauf mit einer Masse von 650 g belastete. Diese Belastung entstand durch ein in 15 cm Höhe über einem Haltestift befestigtes Gewicht und 50 g Eigengewicht des Stempels. Mit manuellem Lösen des Haltestiftes fiel das Gewicht entlang einer Führungsstange auf den Stempel und erzeugte eine standardisierte geschlossene Querfraktur von Tibia und Fibula, ohne ein wesentliches Weichteiltrauma zu verursachen.

2.2.3 Titankirschnerdrähte als Implantate und Beschichtung

Zur Versorgung der Tibiafrakturen wurden in allen Gruppen als intramedulläre Implantate sterile, 15 cm lange Titankirschnerdrähte mit einem Durchmesser von 1,0 mm eingesetzt. Die K-Drähte dienten neben der intramedullären Frakturstabilisierung auch als Wirkstoffapplikatoren für die Wirksubstanzen Simvastatin und BMP-2. Als Trägermaterial für die Wirksubstanzen wurde Poly[D,L-Laktid] verwendet. Das PDLLA wurde in Ethylacetat gelöst, sterilfiltriert und nachfolgend die sterilen Wirksubstanzen in gewählter Konzentration hinzu gegeben. In die so hergestellte Lösung wurden die K-Drähte eingetaucht und anschließend getrocknet. Simvastatin wurde in zwei Dosierungen in das PDLLA eingearbeitet, in der Gruppe III in einer geringen Dosierung von 3 µg (Simva low dose) und in der Gruppe IV in einer hohen Dosierung von 50 µg (Simva high dose). Die Titankirschnerdrähte der Gruppe V wurden mit 50 µg rekombinant humanem BMP-2 beschichtet.

2.3 Anästhesie

Um die Versuchstiere schonend zu operieren und eine schmerzfreie Frakturinduktion zu gewährleisten, wurden die Tiere mit einer Kombination aus Inhalations- und Intraperitonealnarkose anästhesiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte inhalativ in einer verschließbaren Plastikbox mit einem Gemisch aus Sauerstoff (0,8 l/min), Lachgas/N_2O (1,2 l/min) und Isofluran (5 Vol.%). Durch die nachfolgende intraperitoneale Applikation eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (60 mg/kgKG) und Xylacinhydrochlorid (4 mg/kgKG) in einer Dosierung von 2 ml/kgKG wurde die Anästhesie aufrecht erhalten (Empfehlung des Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, S. Wolfensohn, University of Oxford). Die Kombinationsnarkose garantierte durch eine sichere Sedation, Relaxation und Analgesie von zirka 60 Minuten die komplikationsfreie Operation.
Die Verlaufsuntersuchungen am siebenten und 14. Tag erfolgten unter inhalativer Kurznarkose mit dem o.g. Sauerstoff-Lachgas-Isofluran-Gemisch in der Narkosebox. Die Narkose wurde für zehn Minuten über eine Gesichtsmaske fortgesetzt.

2.4 Der operative Eingriff

2.4.1 Vorarbeiten

Vor der Operation wurden die Tiere nach der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Vorgehensweise anästhesiert. Danach wurde das Operationsfeld aufgebaut. Der Operationstisch wurde steril abgedeckt und die sterilen chirurgischen Instrumente angeordnet. Bildwandler und C-Bogen wurden in der Umgebung des Operationstisches aufgestellt und die Abbildungsfläche mit einem sterilen Tuch abgedeckt.
Mit ausreichender Narkosetiefe wurde das rechte Hinterbein der Tiere mit einer elektrischen Schermaschine rasiert und mittels Enthaarungscreme verbliebene Haare entfernt. Gegen das Austrocknen der Augen während der Narkose wurde mit Panthenol-Augensalbe behandelt. Nach rektaler Messung der Körpertemperatur und Bestimmung des Körpergewichts wurden die Schwänze der Tiere nach einem in der Arbeitsgruppe definierten Schema verschiedenfarbig markiert und abschließend der zu operierende rechte Hinterlauf sorgfältig desinfiziert.

2.4.2 OP-Technik

Im Anschluss an die Vorbereitung der Versuchstiere und nach wiederholter Sicherstellung der erforderlichen Narkosetiefe wurde die Operation unter sterilen Bedingungen begonnen. Zuerst erfolgte ein 0,5 cm langer Hautschnitt medial entlang der Tuberositas tibiae. Als Orientierung diente dabei der epifasziale Venenplexus (Abb. 8.1, Abb. 8.2). Nach abgeschlossener Hautinzision wurde der Markkanal mit einem ersten Stahlkirschnerdraht des Durchmessers 1,0 mm unter behutsamen Drehbewegungen von anteromedial angebohrt (Abb. 8.3). War der Markkanal eröffnet, wurde der Draht antegrad unter Bildverstärkerkontrolle in den Markraum eingebracht, behutsam vorgeschoben und der Markkanal vorsichtig dilatiert (Abb. 8.4). Beim zweiten Vorbohren wurde ein 0,8 mm Kirschnerdraht weit bis zum Articulatio talocruralis vorgeschoben. Dieses Vorgehen war Voraussetzung für die spätere zuverlässige Verankerung des K-Drahts, da keine zusätzliche Verriegelung durch Schrauben erfolgte. Nach Beendigung des zweiten Vorbohrens wurde das narkotisierte Tier in die Frakturmaschine gelegt und die Tibiafraktur nach der in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Vorgehensweise induziert (Abb. 8.5). Das Frakturergebnis wurde mit dem Bildverstärker überprüft. Nach erfolgreicher Frakturinduktion wurde die gebrochene Tibia nach bestimmter Gruppenzugehörigkeit mit einem unbeschichteten oder beschichteten Kirschnerdraht

(Ø 1,0 mm) stabilisiert. Dann wurde der überstehende Drahtanteil entfernt (Abb. 8.6). Danach wurde die korrekte Lage des Kirschnerdrahtes mit dem Bildverstärker kontrolliert. Zum Abschluss der Operation erfolgte eine sorgsame Wunddesinfektion. Die Wunden wurden mittels Naht in Einzelknopftechnik und nachfolgenden Sprühpflasterverbandes verschlossen. Abschließend wurde ein schützender radiärer Verband angelegt, um das Repositionsergebnis im frühen postoperativen Verlauf nicht zu beeinträchtigen. Die Tiere wurden nach der erfolgten Operation in ihre Käfige gelegt. In der Umgebung der Käfige war eine Wärmelampe aufgestellt. So wurde eine schonende Aufwachphase der Tiere gesichert. Während der postoperativen Aufwachphase wurden die Tiere fortlaufend überwacht.

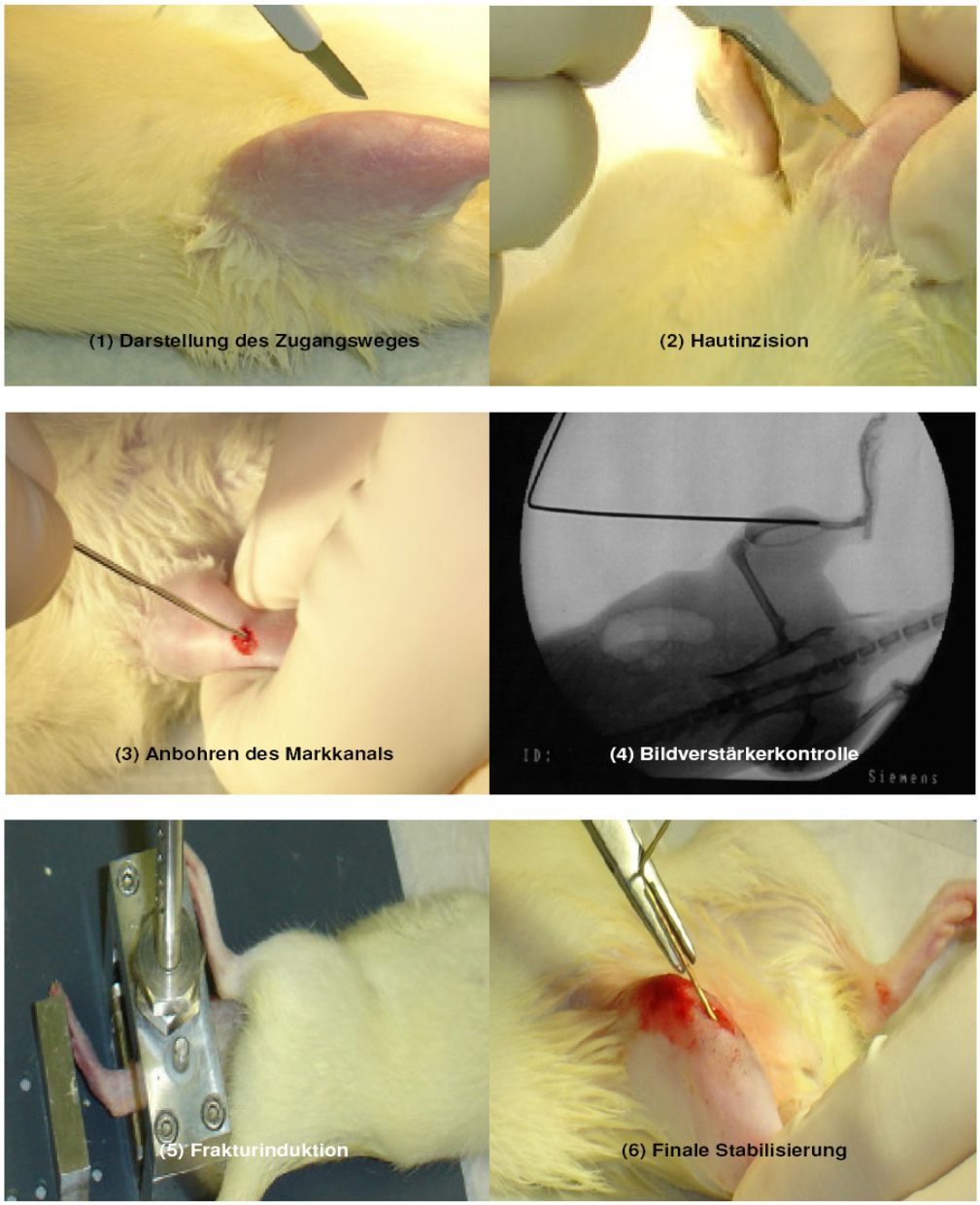


Abb. 8: OP-Technik

2.5 Untersuchungen der Versuchstiere

2.5.1 Postoperative Kontrollen

Im postoperativen Verlauf wurden regelmäßig die Wundverhältnisse und die klinisch fassbare allgemeine Aktivität der Versuchstiere sowie ihr Fress- und Trinkverhalten kontrolliert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Belastbarkeit des operierten Hinterlaufs gelegt.

2.5.2 Gewicht- und Temperaturbestimmung

Die Bestimmung von Körpergewicht und Körpertemperatur erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1 dargestellt.

2.5.3 Radiologie

Postoperativ sowie an den Tagen sieben, 14 und 28 wurden Röntgenaufnahmen in konventioneller Technik in zwei Ebenen lateral und posterior-anterior angefertigt (Abb. 9).

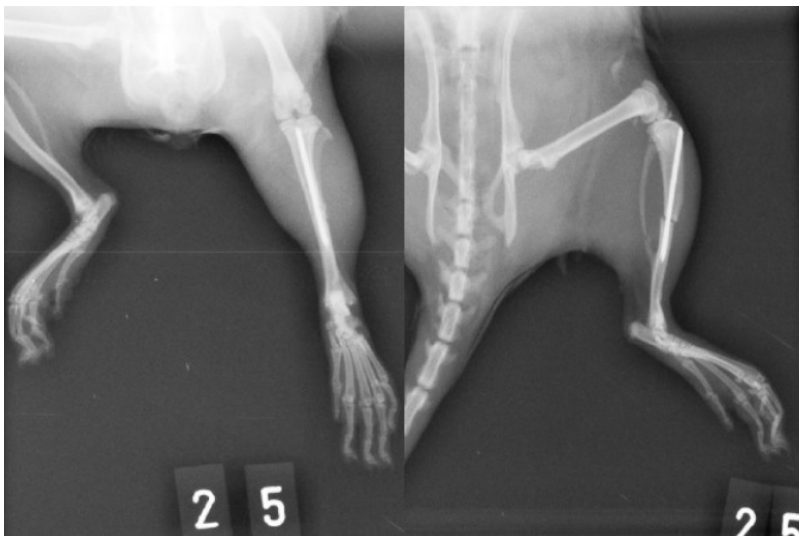


Abb. 9: Exemplarische postoperative Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen
Links posterior-anteriorer, rechts lateraler Strahlengang

Das postoperative Röntgen erfolgte zur Kontrolle des Fraktur- und des Repositionsergebnisses, und es wurde eine Einteilung der induzierten Frakturen gemäß der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO) vorgenommen. Die Röntgenuntersuchungen an den Tagen sieben und 14 dienten der Überwachung des allgemeinen Heilungsverlaufes. Am 28. Tag wurden die Versuchstiere abschließend geröntgt. Zur Beurteilung des erreichten Heilungsstadiums wurden die finalen Auf-

nahmen mittels eines standardisierten Röntgenscores ausgewertet, wobei die Auswertung von drei unabhängigen Beobachtern vorgenommen wurde (Tab. 2).

Tab. 2: Röntgenscore [94]

Kategorie	Kriterien
A	Keine Überbrückung der Cortices
B	Inkomplette Überbrückung einer bis drei Cortices
C	Komplette Überbrückung aller vier Cortices

Das Ergebnis der Auszählung ließ einen Rückschluss auf den Grad der Heilung in den Gruppen zu. Je höher der Anteil von Tieren, die der Kategorie C zugeordnet wurden, desto weiter war die Heilung vorangeschritten.

Für die Aufnahme der Röntgenbilder in 52 kV Strahlenhärte und 1,8 mAs Belichtungszeit wurden die Tiere in Bauchlage auf Röntgenplatten gelagert. Dabei betrug der Abstand zwischen der Röntgenplatte und dem Röntgengerät 60 cm (Abb. 10).

Abb. 10: Arbeitsplatz zur Anfertigung der Röntgenaufnahmen

Auf die Röntgenplatten wurden Röntgenzahlen gelegt, um die richtige Zuordnung der Tiere sicher zu stellen. Für die Röntgenbilder im posterior-anterioren Strahlengang wurde der Hinterlauf dorsal extendiert und mit einem Pflaster fixiert, für die lateralen Röntgenaufnahmen wurde das Bein abduziert und seitlich am Fuß befestigt.

2.6 Tötung und Präparatentnahme

Am 28. Tag postoperativ wurden die Versuchstiere der Tötung zugeführt, dazu mittels Kombinationsnarkose tief narkotisiert, siehe auch Abschnitt 2.3, und im Anschluss daran durch intrakardiale Injektion von 2 ml 14,9%iger Kaliumchloridlösung getötet. Nach Feststellung des sicher eingetretenen Todes erfolgte die Entnahme der Knochenpräparate. Der Hinterlauf wurde zuerst vollständig vom Situs abgetrennt. Dann wurden Fell und Haut der Tibia sowie darunter liegende Muskeln und Sehnen vorsichtig durchtrennt. Die weitere Präparation erfolgte unter sehr sorgfältiger Schonung des Knochens, insbesondere der kallösen Bereiche. Nach Exartikulation im Articulatio genus wurden Tibia und Fibula vom Femur abgezwickt, danach Articulatio talocruralis und Fibula reseziert (Abb. 11.1) und der Kirschnerdraht mittels einer Fasszange behutsam aus der Tibia herausgelöst (Abb. 11.2).

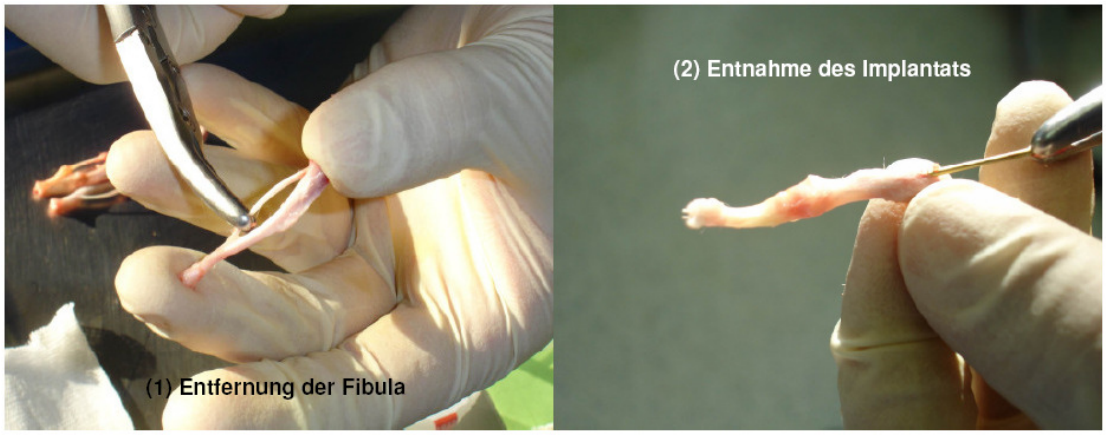


Abb. 11: Präparation und Implantatentnahme

Für die biomechanischen Testungen wurde neben dem frakturierten, rechten Hinterlauf auch das gesunde, kontralaterale Bein entnommen. Die frei präparierten Tibiae wurden umgehend in Kochsalzlösung getränkte Kompressen eingewickelt, um die Präparatqualität nicht durch austrocknende Prozesse zu minimieren. Dann wurden die Knochenpräparate rasch der biomechanischen Testung zugeführt.
Die histologisch zu untersuchenden Tibiae wurden nach der Präparation sofort in Plastikkassetten und danach in Fixierlösung gelegt.

2.7 Biomechanik

2.7.1 Einbetten

Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die frei präparierten Tibiae in Gussformen eingebettet. In Höhe des Tibiaplateaus wurde die Tibia in einem Ständer mittels Haltevorrichtung fixiert (Abb. 12.1). Das distale Ende der Tibia hing bis in die darunter platzierte Gussform. Durch drei bewegliche Ebenen des Ständers wurde die Tibia senkrecht und zentriert ausgerichtet. Mittels Visierhilfe wurde diese Ausrichtung sichergestellt. Die Gussformen wurden für das Einbetten der Tibiae mit dem schnell aushärtenden Einbettzement Beracryl gefüllt (Abb. 12.2). Innerhalb der 20-minütigen Aushärtung des Beracryls wurde die Tibia zum Schutz vor Austrocknung fortlaufend mit Kochsalzlösung befeuchtet. Nachdem der Einbettzement ausgehärtet war, erfolgte die Einbettung des proximalen Tibiaanteils durch eine halbe Drehung der Tibia. Damit war die Gussform mit dem eingebetteten distalen Ende der Tibia im Ständer eingespannt. Der festgelegte Abstand von 1,8 cm zwischen den Gussformen wurde durch einen Messschieber kontrolliert (Abb. 12.3).

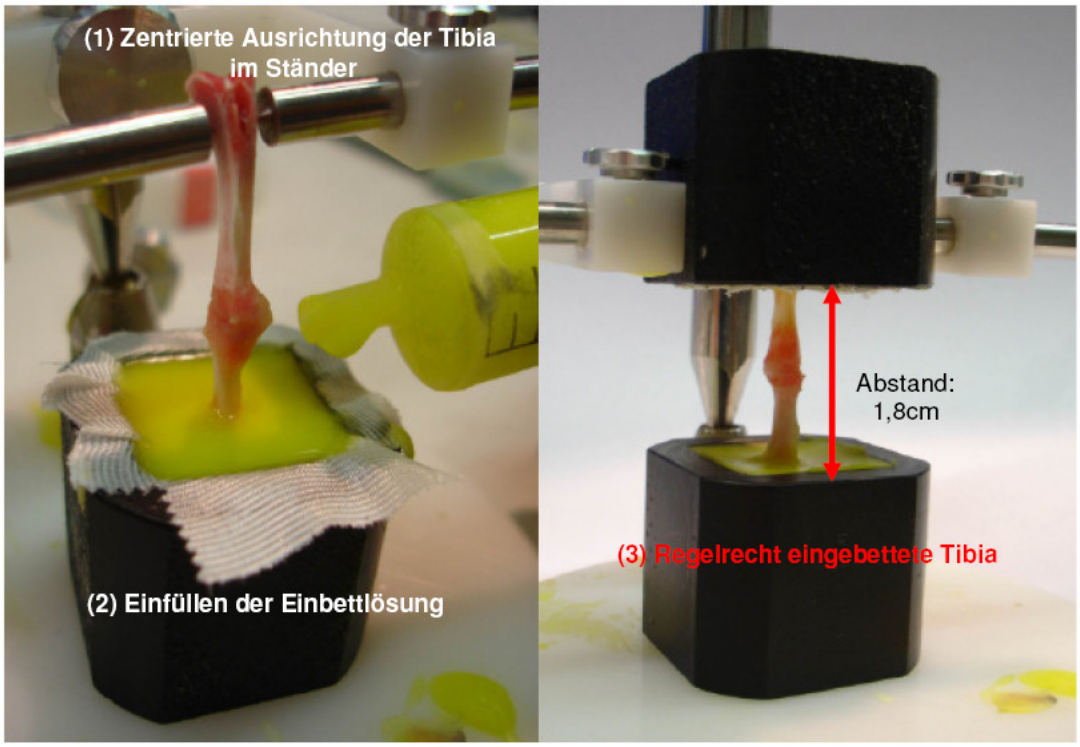


Abb. 12: Technik des Einbettens

2.7.2 Torsionale Testung mittels Zwick

Die biomechanischen Testungen der Tibiae erfolgten mit der Materialprüfmaschine Zwick. Vor Beginn des Testungsvorgangs mittels Zwick wurden die Tibiae in einer Torsionsmaschine für Kleintierknochen befestigt (Abb. 13). Die Torsionsmaschine war mit einem Gewicht verbunden, das die axiale Vorlast der Tibia in Höhe von 5 N bewirkte. Die Vorlast stellte gleichmäßige Druckverhältnisse über die gesamte Tibia sicher. So wurden Belastungen durch Zug begrenzt, die bei torsionalen Testungen entstehen. Der Testungsvorgang begann, wenn die Zwick in konstanter Geschwindigkeit herunterlief. Über den Hebelarm an der Torsionsmaschine wurde die Krafteinwirkung der Zwick aufgenommen, auf die Torsionsmaschine übertragen und in eine Drehbewegung transformiert. Die induzierte Torsion wurde durch die Kraftmessdose aufgenommen. Der Messkraftverstärker leitete Daten an einen Computer, die zur Weiterverarbeitung in der Software Catman als ASCII mit Header-Datei gespeichert wurden. Hielt die Tibia der ansteigenden Torsion nicht mehr stand und brach, wurde der Testungsvorgang beendet. Die Testungsvorgänge mittels Zwick wurden automatisch abgebrochen, wenn Messwerte bestimmt wurden, die um acht Prozent von den bereits ermittelten Daten differierten.

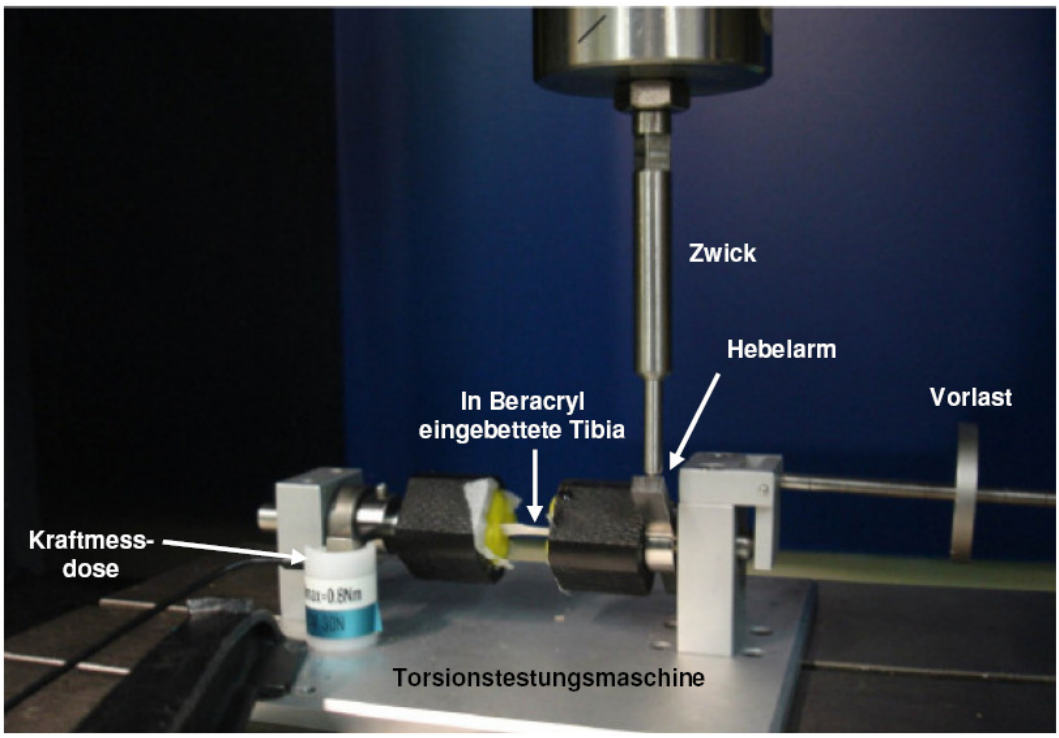


Abb. 13: Versuchsaufbau zur biomechanischen Testung der Tibiae mit der Torsionsmaschine (modifiziert nach [94])

2.7.3 Verarbeitung der gemessenen Daten

Zur Auswertung der biomechanischen Untersuchungen wurden die Parameter torsionale Steifigkeit und maximales Drehmoment herangezogen. Diese wurden zuerst getrennt für die frakturierte Tibia und für die kontralaterale, gesunde Tibia ermittelt und nachfolgend als frakturiert/kontralateral gesund x 100 dargestellt.

Die nach der Testung mittels Zwick gespeicherten Rohdaten, pro Testung etwa 5.000 bis 10.000 Messwerte, wurden zur weiteren Auswertung in die Software Excel übertragen und graphisch dargestellt. Auf der Y-Achse wurde das Drehmoment in [Nmm] und auf der X-Achse die Winkeländerung der Tibia in [°] aufgetragen. Die Steigung des erstellten Graphen [$m = Y_b-Y_a/X_b-X_a$] definierte die zu bestimmende torsionale Steifigkeit, und der höchste Punkt des Graphen entsprach dem maximalen Drehmoment. Für die exakte Ermittlung der Steifigkeit war es notwendig, die Daten in eine Arbeitshilfe mit einer integrierten Ausgleichsgeraden zu übertragen. Die torsionale Steifigkeit wurde bestimmt, indem die Ausgleichsgerade exakt am linear ansteigenden ersten Drittel des Graphen angelegt wurde. Aus der Arbeitshilfe wurde auch der Wert für das maximale Drehmoment abgelesen (Abb. 14).

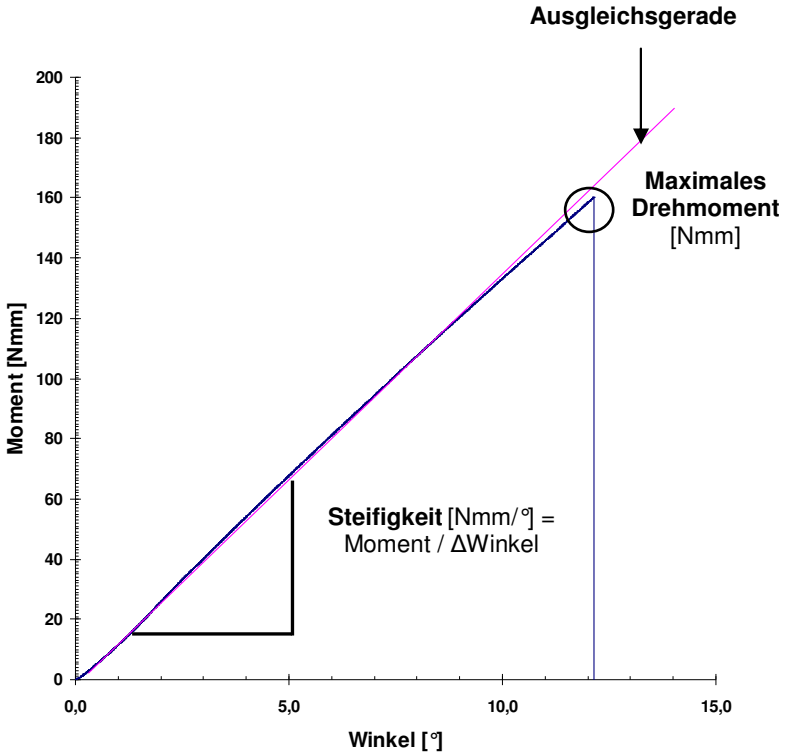


Abb. 14: Exemplarischer Verlauf der Belastungs-Deformitätskurve einer Ratte 28 Tage postoperativ
Ausgleichsgerade hellrot zur Ermittlung der Steifigkeit, Kreis markiert das maximale Drehmoment

2.8 Histologie

2.8.1 Knochenaufbereitung

Die Knochenaufbereitung für die histologischen Untersuchungen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll mit Fixierung, Entwässerung, Entfettung, Präinfiltration, Infiltation und abschließender Einbettung:

Nach der Knochenpräparation verblieben die Tibiae bei einer konstanten Temperatur von 25°C drei bis vier Tage auf einem Schüttler, um das gleichmäßige Eindringen der Fixierlösung in die Tibiae zu garantieren. Die Präparate wurden anschließend zehn Minuten mit Leitungswasser gespült und danach durch eine ansteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100%) für jeweils eine Woche entwässert. Abschließend wurden die Knochenpräparate mit dem Intermedium Xylol über 24 Stunden entfettet.

Als Medium für die Präinfiltration, Infiltration und Einbettung wurde Technovit 9100 neu, ein Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat zur Herstellung von histologischen Schnitten in Hartschnitt-Technik, verwendet. Technovit 9100 neu wird potenziell als gesundheitsgefährdend eingestuft. Deshalb wurde mit diesem Kunststoff nur unter dem Abzug gearbeitet und die Lösungen in speziellen Kanistern entsorgt.

Die mit Xylol entfetteten Knochenpräparate wurden für sieben Tage bei Raumtemperatur mit Technovit präinfiltriert. Dann erfolgte die siebentägige Infiltration in Technovit bei einer Temperatur von 4°C. Für das abschließende Einbetten wurde ein Gemisch aus neun Volumenanteilen einer Stammlösung A und einem Volumenanteil einer Stammlösung B verwendet. Zum Einbetten wurden die Tibiae zentriert in verschließbare Plastikgefäße gelegt, langsam bis zum oberen Rand mit dem Stammlösungsgemisch übergossen und luftdicht verschlossen im Kühlschrank für mindestens 24 Stunden aufbewahrt. Nach Aushärtung des Kunststoffes wurden die Blöcke zum vereinfachten Einspannen im Mikrotom mit Technovit 3040 aufgeblockt und danach, bis der Knochen an der Oberfläche deutlich sichtbar wurde, angeschliffen.

2.8.2 Herstellung der histologischen Schnitte

Zur Herstellung der histologischen Schnitte in einer Dicke von 6 µm wurden die angeschliffenen Kunststoffblöcke mit einem Mikrotom geschnitten (Abb. 15).

Abb. 15: Mikrotom mit eingespanntem Schnittpräparat im Kunststoffblock

Vor Beginn des Schneidevorgangs wurden die Blöcke fest im Mikrotom eingespannt und in senkrechter Position zum Schneidemesser ausgerichtet. Das Schneiden wurde bis zum Erreichen der Zielebene vorgenommen, die durch die freie Abgrenzung des Markkanals über das gesamte Schnittpräparat definiert war. Nach Erreichen der gewünschten Zielebene wurden nacheinander zehn Schnitte behutsam vom Block abgenommen und auf mit Alkohol benetzte Objektträger gelegt. Zur Sicherstellung einer guten Präparatqualität wurden unregelmäßige Anteile im Schnittpräparat mit einem feinen Pinsel korrigiert und zusätzlich Streckflüssigkeit auf die Schnittpräparate pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte mit spezieller Kisol-Folie abgedeckt und der verbleibende Alkohol mit Filterpapier entfernt. Abschließend wurden die Präparate in eine Presse gelegt und für zwei Tage im Wärmeschrank bei 60°C gepresst. Das garantierte die sichere Haftung der Schnittpräparate am Objektträger.

2.8.3 Färben der histologischen Präparate

Nach erfolgter Lagerung im Wärmeschrank wurden die Schnittpräparate aus der Presse entnommen und nach einem definierten Färbeprotokoll mit der Versilberung nach von Kossa- und mit der Methylgrün/van Gieson-Färbung gefärbt (Tab. 3).

Tab. 3: Färbeanleitung Versilberung nach von Kossa *Färbeanleitung Methylgrün/van Gieson*

	Färbeschritt	Zeit [min]	Färbeschritt	Zeit [min]
1.	Schnitte entplasten mit MEA	3x20	Schnitte entplasten mit MEA	3x20
2.	Absteigende Alkoholreihe 100, 96, 80, 70%	je 2	Absteigende Alkoholreihe 100, 96, 80, 70%	je 2
3.	Aqua dest.	2	Aqua dest.	Kurz
4.	3%ige Silbernitratlösung	5	Methylgrün	40
5.	Aqua dest.	Kurz	Aqua dest.	Kurz
6.	Reduktion in Natrium-Formaldehydlösung	2	70% EtOH	
7.	Leitungswasser	10	Van Gieson	2
8.	5% Natriumthiosulfat	5	70% EtOH	
9.	Leitungswasser	10		
10.	Aqua dest.	Kurz		
11.	Aufsteigende Alkoholreihe 70, 80, 96, 100%	je 2	Aufsteigende Alkoholreihe 70, 80, 96, 100%	je 2
12.	Xylol	2x5	Xylol	2x5
13.	Eindecken mit Vitroclud		Eindecken mit Vitroclud	

In der Versilberung nach von Kossa wurden mineralisiertes Knochen- und Knorpelgewebe schwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und Knorpel- sowie Bindegewebe braun gefärbt (Abb. 16). Durch die Methylgrün/van Gieson-Färbung stellte sich Knochen rot, Knorpelgewebe blaugrün und Bindegewebe hellrot dar (Abb. 16).

Abb. 16: Färbeergebnisse am Beispiel von histologischen sagittalen Schnittpräparaten einer Ratte
Links Versilberung nach von Kossa-, rechts Methylgrün/van Gieson-Färbung

2.8.4 Lichtmikroskopische Beurteilung

Nach erfolgter Färbung aller Schnittpräparate wurden die Präparate histomorphologisch unter dem Lichtmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen beurteilt.

2.8.5 Histomorphometrische Auswertung mit der Bildanalyse

Neben der histomorphologischen Begutachtung wurde zusätzlich die Methode der Histomorphometrie angewandt, um gewebliche Veränderungen im Frakturkallus quantitativ zu analysieren. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm KS 400, mit dem folgende Parameter bestimmt wurden:

Ti.Dm (Tibiadurchmesser oder Baseline) [mm]

Ct. (Kortikalis)	Ct.Ar (Gesamtfläche Kortikalis) [mm²] Md.Ar/Ct.Ar (Knöcherner Anteil Kortikalis) [%]
Cl. (Gesamtkallus)	Cl.Ar (Gesamtfläche Kallus) [mm²] Md.Ar.Cl (Knöcherne Fläche Gesamtkallus) [mm²] Md.Ar/Cl.Ar (Knöcherner Anteil Gesamtkallus) [%] Cg.Ar.Cl (Knorpelfläche Gesamtkallus) [mm²] Cg.Ar/Cl.Ar (Knorpelanteil Gesamtkallus) [%]
Ps. (Periostaler Kallus)	Ps.Cl.Ar (Gesamtfläche periostaler Kallus) [mm²] Ps.Cl.Ar/Ti.Dm (Fläche periostaler Kallus/ Baseline) [mm] Md.Ar.Ps.Cl (Knöcherne Fläche periostaler Kallus) [mm²] Md.Ar/Ps.Cl.Ar (Knöcherner Anteil periostaler Kallus) [%] Cg.Ar.Ps.Cl (Knorpelfläche periostaler Kallus) [mm²] Cg.Ar/Ps.Cl.Ar (Knorpelanteil periostaler Kallus) [%]
Es. (Endostaler Kallus)	Es.Cl.Ar (Gesamtfläche endostaler Kallus) [mm²] Md.Ar.Es.Cl (Knöcherne Fläche endostaler Kallus) [mm²] Md.Ar/Es.Cl.Ar (Knöcherner Anteil endostaler Kallus) [%] Cg.Ar.Es.Cl (Knorpelfläche endostaler Kallus) [mm²] Cg.Ar/Es.Cl.Ar (Knorpelanteil endostaler Kallus) [%]

Die Bezeichnung der Parameter folgte der Empfehlung von Parfitt zur Vereinheitlichung der Nomenklatur von histomorphometrischen Untersuchungen [95] (Tab. 4).

Tab. 4: Abkürzungsverzeichnis nach Parfitt [95]

Ar	Area
Cg	Cartilage
Cl	Callus (nicht Teil der Klassifikation nach Parfitt)
Ct	Cortex
Es	Endosteal
Md	Mineralized
Ps	Periosteal
Ti.Dm	Tibial Diameter

Praktisches Vorgehen mit der Bildanalyse

Die Messungen mit KS 400 wurden für die Färbungen von Kossa und Methylgrün/ van Gieson getrennt durchgeführt. Jede Messung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Flächen im distalen, danach im proximalen Anteil des Frakturkallus errechnet und durch Addition das Ergebnis für das Gesamtpräparat ermittelt.

Vor Beginn der histomorphometrischen Auswertung wurden die gefärbten Schnittpräparate unter dem Mikroskrop, das an eine Digitalkamera angeschlossen war, fotografiert. Mit Hilfe des Programms Axio Vision wurde auch ein Maßstabsbalken von 5 mm Länge aufgenommen. Die digitalisierten Schnittpräparate wurden dann auf dem Computer gespeichert und im Programm KS 400 weiter bearbeitet. Bei jeder Messung mit KS 400 wurde zunächst die Kalibrierung vorgenommen, indem ein Rahmen exakt an den Maßstabsbalken angelegt wurde. Zum Abschluss der Kalibrierung wurde die Einheit [mm] der zu berechnenden Bereiche festgelegt. Dann wurden nacheinander die Flächen des periostalen und des endostalen Kallus sowie der Kortikalis manuell farbig markiert. Nach Markierung sämtlicher Bereiche wurde eine „Region of Interest“ (ROI) festgelegt (Abb. 17).

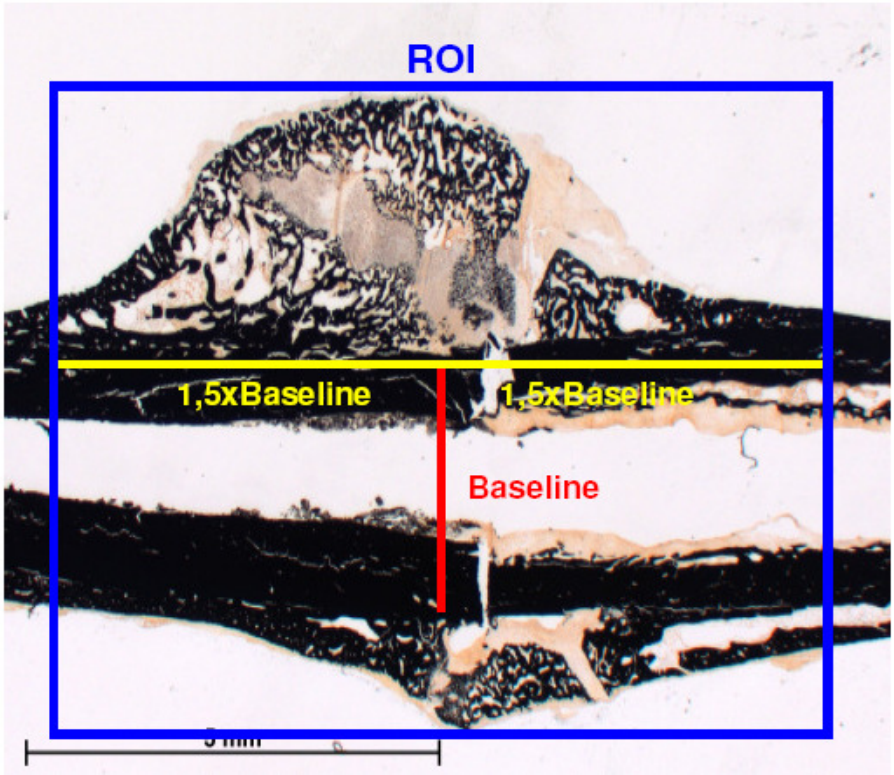


Abb. 17: Region of Interest (ROI)
ROI am Beispiel eines histologischen Schnittpräparats einer Ratte, gefärbt nach von Kossa

Dazu wurde der Tibiadurchmesser (Baseline), der Abstand zwischen der Außenseite der ventralen zu der Außenseite der dorsalen Kortikalis, ausgemessen. Die 1,5fache Verlängerung der Baseline definierte die Ausdehnung der ROI nach proximal und distal. In der Breite schloss die ROI den gesamten Frakturkallusdurchmesser ein (Abb. 17). Innerhalb der ROI wurden in den von Kossa gefärbten Präparaten die knöchernen Bereiche und in den Methylgrün/van Gieson gefärbten Schnitten die knorpeligen Areale im Frakturkallus errechnet.
Da die manuelle Markierung gegebenenfalls nicht gewünschte Areale enthielt, wurde vor Beendigung des Messvorgangs mit KS 400 eine Segmentierung durchgeführt. Durch die Segmentierung wurde eine Binärmaske vorgegeben, die zwei Farbinformationen differenzierte. Wenn auch im Rahmen der Segmentierung nicht geforderte Flächen mit einbezogen waren, erfolgte abschließend eine manuelle Korrektur zur Sicherstellung der exakten Flächenberechnung.

2.9 Statistik

Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit der Software Excel (Excel Version 2003, Microsoft, USA). Es wurden die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen errechnet.
Die Erstellung von Boxplots und die statistische Auswertung wurden mit der Software SPSS durchgeführt (SPSS Version 14.0, USA). Es wurden Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $p<0,05$ angewandt. Die Post-Hoc-Kontrolle der ermittelten Daten erfolgte mit dem Bonferroni-Holm-Verfahren, bei dem der p-Wert hinsichtlich der Mehrgruppenvergleiche angepasst wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Ausfälle, Operationstoleranz und postoperativer Verlauf

3.1.1 Ausfälle

Zwei Tiere verstarben nach Injektion des Narkotikums unklarer Ursache, fünf Tiere mussten aufgrund einer komplizierten Mehrfragmentfraktur intraoperativ getötet werden, bei drei Tieren wurden postoperativ Lockerungen des Osteosynthesematerials festgestellt, aus ungeklärten Ursachen wurden zwei Tiere tot im Käfig aufgefunden, und zwei Tiere konnten aufgrund von Präparationsfehlern nicht den abschließenden Untersuchungen zugeführt werden. Eine besondere Gruppenzugehörigkeit war hierbei nicht deutlich.

3.1.2 Operationstoleranz und postoperativer Verlauf

Alle in die Studie eingeschlossenen Versuchstiere tolerierten die Operation gut und rehabilitierten schnell von den Eingriffen. Bei keinem Versuchstier wurden Wundkomplikationen oder makroskopische Zeichen von Infektionen festgestellt. Der postoperative Verlauf war komplikationsfrei, und alle Versuchstiere konnten die operierte Extremität schnell voll belasten.

3.2 Untersuchungen der Versuchstiere

3.2.1 Körpergewicht und Körpertemperatur

Das Körpergewicht und die Körpertemperatur der Versuchstiere wurden präoperativ, nach sieben und 14 Tagen sowie am 28. Tag bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung in graphischer Form dargestellt (Abb. 18).

Die Entwicklung des Körpergewichts unterlag in allen Gruppen keinen pathologischen Schwankungen. Nach 28 Tagen wurde bei allen Versuchstieren eine Zunahme des Körpergewichts im Vergleich zum Studienbeginn ermittelt (Abb. 18).

Über den Studienzeitraum wurden zu keiner Zeit erhöhte Temperaturen als Hinweis für eine systemische Infektion gemessen (Abb. 18).

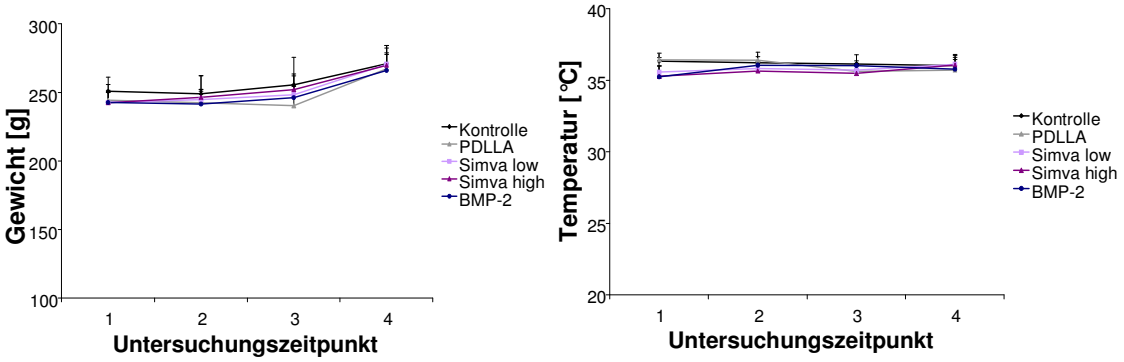


Abb. 18: Körpergewicht und Körpertemperatur im Gruppenvergleich über den Studienzeitraum
Links Körpergewicht, rechts Körpertemperatur
Untersuchungszeitpunkt 1: Tag der Operation, 2: Tag sieben, 3: Tag 14, 4: Tötungstag 28

3.2.2 Radiologie

An vier festgelegten Untersuchungszeitpunkten: Tag 0, sieben, 14 und 28 wurden konventionelle Röntgenbilder in zwei Ebenen posterior-anterior und lateral aufgenommen.

- **Postoperative Frakturklassifikation**

Zur Kontrolle des Frakturergebnisses wurden die postoperativ erstellten Röntgenbilder in Anlehnung an die Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO) eingeteilt:

In 62% der Fälle kam es zu einer reinen Querfraktur 42-A3 gemäß der AO-Klassifikation. In 29% der Fälle wurde eine nicht dislozierte Schrägfrakur 42-A2 und in 9% der Fälle das Auftreten eines Biegungskeils gemäß AO 42-B2 festgestellt. Es gab keine Frakturen vom Typ 42-B3, -C1, -C2 oder -C3 (Abb. 19).

	42-A1	42-A2	42-A3	42-B1	42-B2	42-B3
Anzahl [%]	-	29	62	-	9	-

Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Frakturtypen gemäß AO-Klassifikation (modifiziert nach [96])

- **Radiologische Verlaufskontrollen**

Zur Beurteilung des allgemeinen Heilungsverlaufes wurden Röntgenbilder sieben und 14 Tage postoperativ aufgenommen und diese mit den initial postoperativen

und den finalen Aufnahmen verglichen. Bei allen radiologisch untersuchten Tieren war unmittelbar post operationem der Frakturspalt deutlich sichtbar. Im Heilungsverlauf war bei allen Tieren die Ausbildung einer Kalluswolke um die Frakturenden abzugrenzen und eine regelrechte vergleichbare Implantatlage festzustellen. Es zeigten sich keine Dislokationen oder Brüche des Osteosynthesematerials und keine Osteolysen oder Infektzeichen.

- **Beurteilung des Heilungsstadiums 28 Tage postoperativ**

28 Tage postoperativ waren der Frakturspalt und eine periostale Kallusformation noch deutlich in der Kontroll-, der PDLLA- und in der Simvastatin low behandelten Gruppe abgrenzbar, wohingegen der Frakturspalt bei den Simvastatin high behandelten Tieren und den Tieren der Positivkontrollgruppe BMP-2 zunehmend unschärfer sichtbar war (Abb. 20).

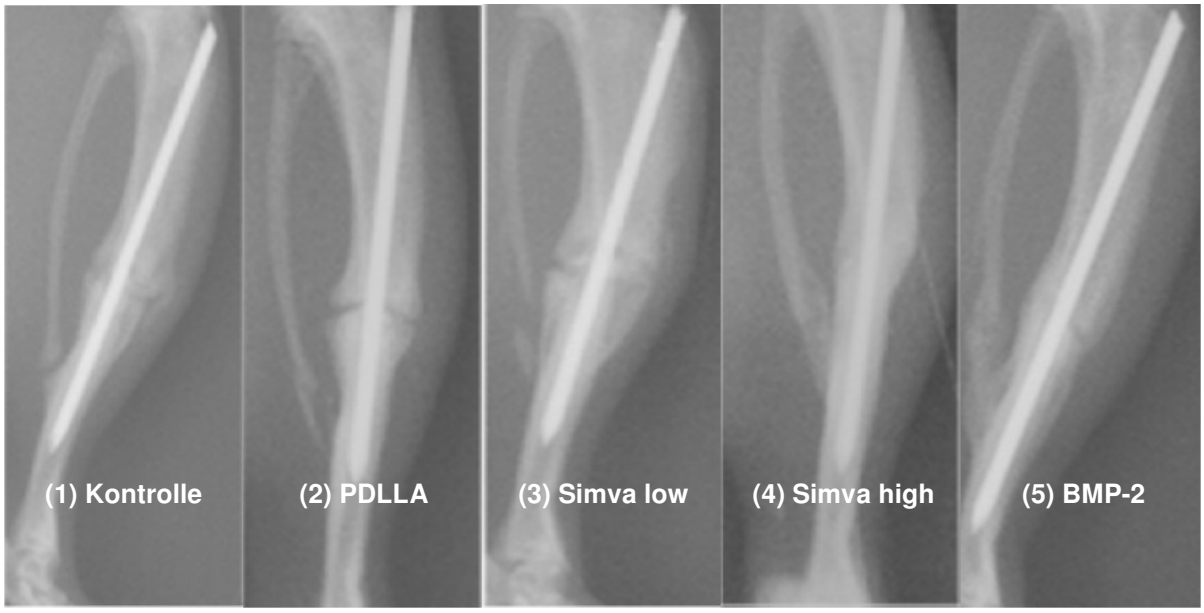


Abb. 20: Exemplarische laterale Röntgenaufnahmen im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

Unter Verwendung eines Röntgenscores wurde das Heilungsstadium der Versuchstiere in die Kategorien A bis C eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte auf der Grundlage des Auszählens der überbrückten Cortices.

Kein Tier der Kontroll- und der PDLLA-Gruppe zeigte nach 28 Tagen eine komplette Überbrückung des Frakturspaltes (Kategorie C). In beiden Gruppen wurden jeweils vier Fälle ohne nachweisbare Konsolidierung (Kategorie A) und fünf Fälle mit nur inkompletter Überbrückung festgestellt (Kategorie B). In der Simvastatin low behandelten Gruppe war der Frakturspalt bei drei Tieren noch nicht überbrückt

(Kategorie A), fünf Tiere waren inkomplett überbrückt (Kategorie B) und ein Tier bereits ganz konsolidiert (Kategorie C). Sowohl in der Simvastatin high behandelten Gruppe als auch in der Positivkontrollgruppe BMP-2 wurden jeweils zwei Fälle von kompletter Konsolidierung der Cortices festgestellt (Kategorie C), und die überwiegende Mehrzahl (13 Tiere) in diesen beiden Gruppen war bereits inkomplett überbrückt (Kategorie B) (Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse des Röntgenscores im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

Gruppe	Kategorie A	Kategorie B	Kategorie C
Kontrolle	4	5	0
PDLLA	4	5	0
Simva low	3	5	1
Simva high	0	7	2
BMP-2	1	6	2

3.3 Biomechanik

Im Rahmen der biomechanischen Untersuchung wurden sowohl die frakturierte als auch die nicht gebrochene Tibia aller Tiere torsional getestet. Die Auswertung der biomechanischen Untersuchung erfolgte anhand der Parameter maximales Drehmoment und torsionale Steifigkeit. Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Die Ergebnisse für die frakturierte Tibia wurden als prozentualer Anteil zur gesunden, nicht gebrochenen Tibia in Form von Boxplots dargestellt (Abb. 21, Abb. 22).

3.3.1 Drehmoment

28 Tage postoperativ wiesen die unbehandelten Kontrolltiere ein maximales Drehmoment von 57,5[%] ± 29,0 auf. Damit waren die frakturierten Tibiae der Kontrolltiere nur zirka halb so stabil wie ihre nicht frakturierten Referenztibiae. Bei einem mittleren Drehmoment von 69,0[%] ± 26,0 lagen auch die frakturierten Tibiae der PDLLA-Gruppe unter ihren korrespondierenden gesunden Tibiae. Im Gegensatz dazu erzielten die frakturierten Tibiae der Simvastatin high behandelten Tiere analog denen der Positivkontrolle BMP-2 höhere Werte als ihre nicht frakturierten Referenztibiae (Simva high: 114,9[%] ± 38,3 und BMP-2: 124,4[%] ± 41,8). Gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren waren die mittleren Drehmomente dieser beiden Gruppen um 100% und mehr erhöht und damit statistisch signifikant

höher als das Drehmoment der Kontrollgruppe. Das Drehmoment der Positivkontrolle war auch statistisch signifikant größer als das der PDLLA-Gruppe.
Das maximale Drehmoment der Simvastatin low behandelten Gruppe betrug im Mittel 95,8[%] ± 65,2. Es war größer als das der Kontroll- und PDLLA-Gruppe, aber ohne statistisch signifikante Differenzen (Abb. 21).

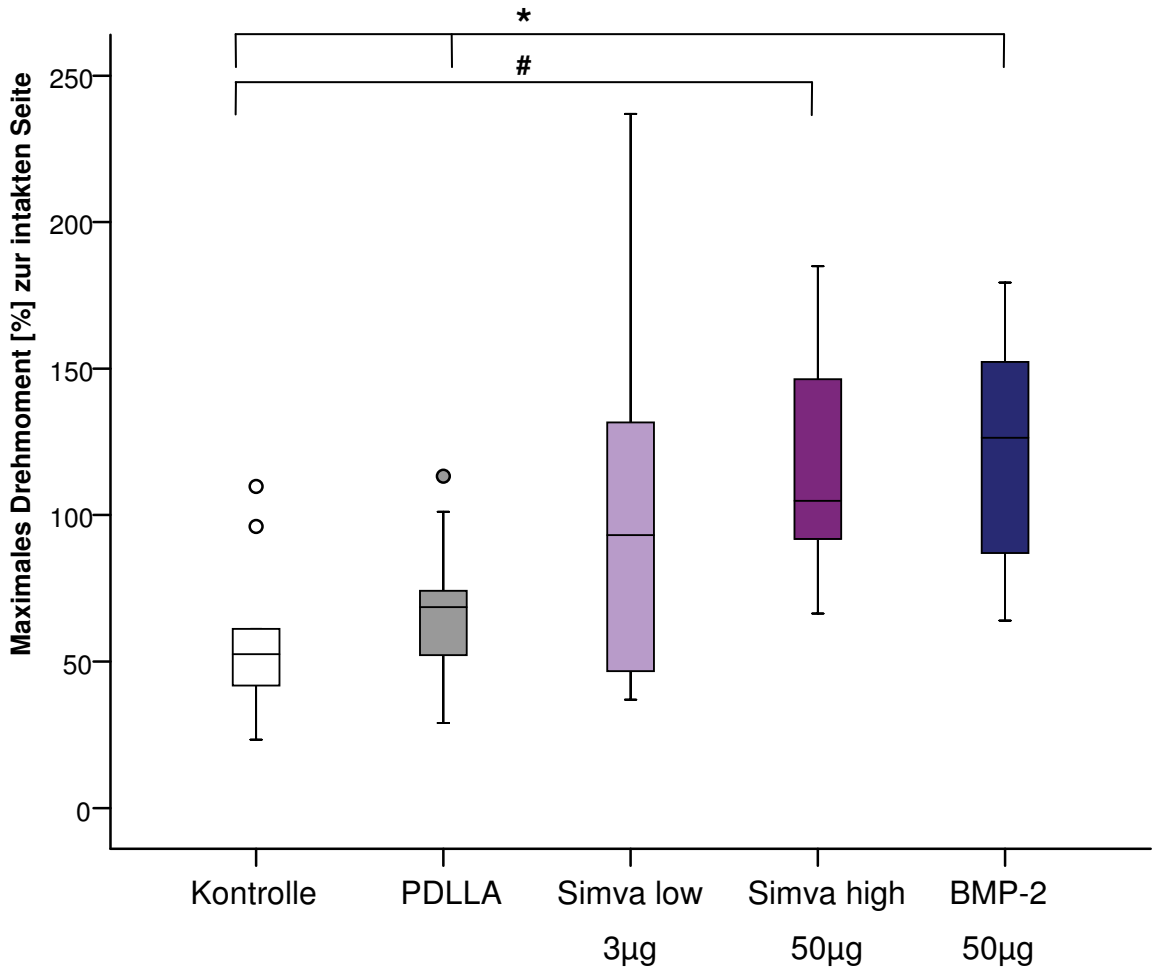


Abb. 21: Maximales Drehmoment [%] zur gesunden Seite im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ
* vs. Kontrolle (p=0.002) und PDLLA (p=0.006) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)
\# vs. Kontrolle (p=0.004) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)
O Extremwerte

3.3.2 Torsionale Steifigkeit

Die torsionale Steifigkeit der unbehandelten Kontrolltibiae betrug 28 Tage postoperativ im Mittel 61,3[%] ± 35,0. Die frakturierten Tibiae zeigten eine geringere Steifigkeit als die gesunden Referenztibiae. Auch die PDLLA-Tiere wiesen geringere Steifigkeiten der frakturierten als der nicht frakturierten Tibiae auf (61,1[%] ± 44,5). Im Unterschied dazu erreichten wiederum die Simvastatin high behandelten Tiere analog den Positivkontrolltieren (BMP-2) höhere Steifigkeiten

als ihre unfrakturierten Referenztibiae (Simva high: 117,1[%] ± 26,1 und BMP-2: 131,1[%] ± 37,1). Gegenüber der Kontrollgruppe war die mittlere torsionale Steifigkeit der beiden Gruppen etwa verdoppelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe wurde nach Bonferroni-Holm-Korrektur lediglich für die Positivkontrollgruppe bestätigt.

Für die Simvastatin low behandelte Gruppe wurde eine mittlere torsionale Steifigkeit von 85,0[%] ± 73,1 bestimmt, woraus sich keine statistisch signifikanten Differenzen gegenüber den anderen Gruppen ergaben (Abb. 22).

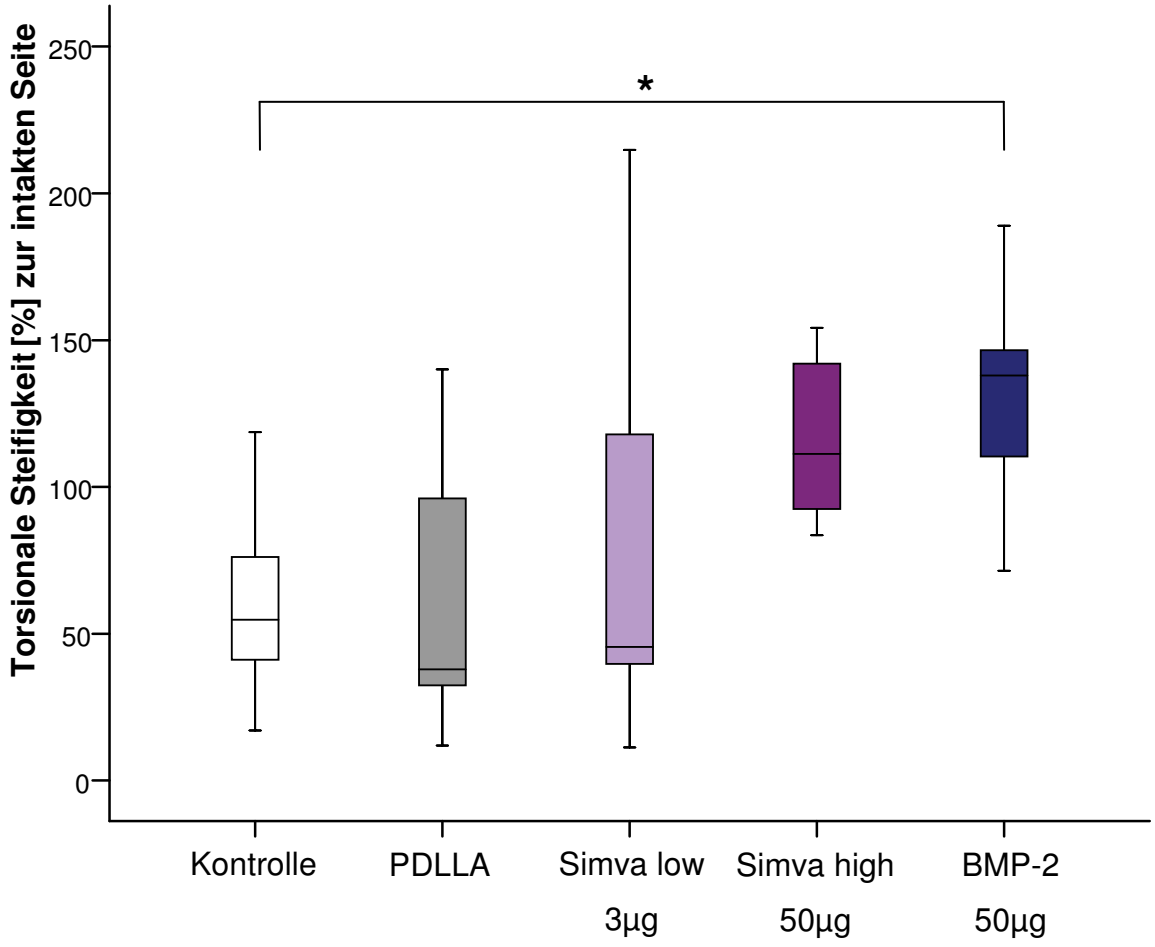


Abb. 22: Torsionale Steifigkeit [%] zur gesunden Seite im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ
* vs. Kontrolle (p=0.003) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)

3.4 Histologie

Die Schnittpräparate wurden histomorphologisch bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Lichtmikroskop beurteilt und mit Hilfe der Bildanalyse quantitativ histomorphometrisch ausgewertet.

3.4.1 Histologische Beobachtungen

Im Folgenden sind exemplarisch histologische sagittale Schnittpräparate der einzelnen Gruppen 28 Tage nach Fraktur dargestellt (Abb. 23). Die Schnitte wurden mit der Versilberung nach von Kossa und mit Methylgrün/van Gieson gefärbt. In der Versilberung nach von Kossa wird mineralisierter Knochen schwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und Knorpel- sowie Bindegewebe braun gefärbt. In der Methylgrün/van Gieson-Färbung stellt sich Knochengewebe intensiv rot, Bindegewebe hellrot und Knorpelgewebe blaugrün dar.

Die histologischen Beobachtungen der Übersichtsaufnahmen ergaben, dass sämtliche Tibiae 28 Tage post operationem im Heilungsprozess waren. Es ließen sich in allen Gruppen Frakturspalt, Kortikalis, periostaler und endostaler Kallus sowie Markkanal abgrenzen (Abb. 23). In jeder Gruppe zeigte sich eine deutliche Ausbildung von periostalem Kallusgewebe, wohingegen der endostale Kallus durch die intramedullär implantierten Kirschnerdrähte insgesamt gering ausgebildet, zum Teil kaum abgrenzbar war. In allen Gruppen war zu beobachten, dass der periostale Kallus zu einer Überbrückung des Frakturspaltes und zu einer Verbindung der Frakturenden führte. Eine komplette knöcherne Überbrückung der Frakturenden wurde in keiner Gruppe festgestellt (Abb. 23).

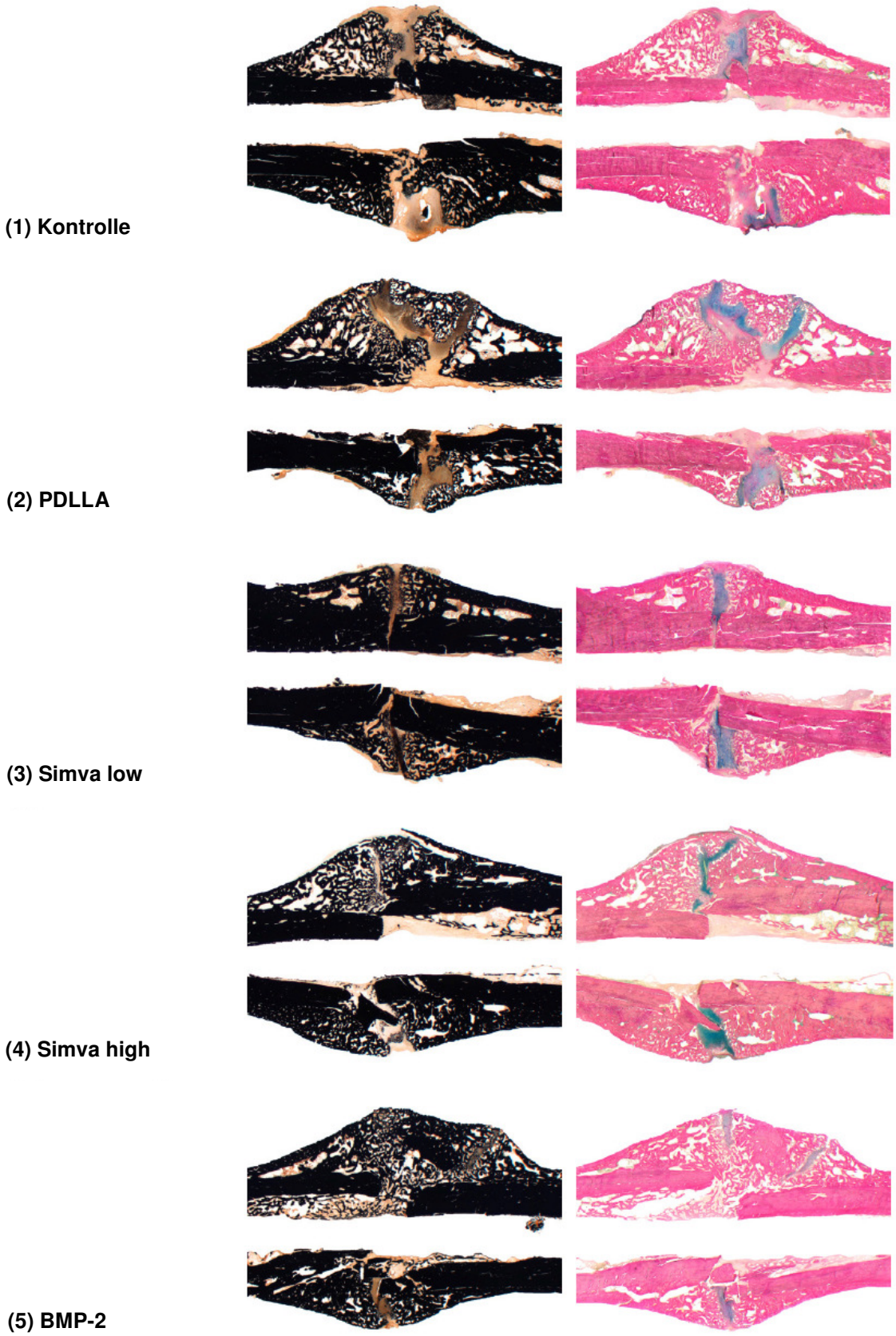


Abb. 23: Exemplarische sagittale histologische Schnittpräparate im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ
Übersichtsaufnahmen, gefärbt nach von Kossa und Methylgrün/van Gieson

In den von Kossa- und in den Methylgrün/van Gieson-Färbungen ließ sich bei höherer Vergrößerung die gewebliche Zusammensetzung des Frakturkallus qualitativ differenzieren. In der von Kossa-Färbung ergab die Beurteilung des Frakturkallus in allen Gruppen folgende Ergebnisse:

Bindegewebige Bereiche färbten sich hellbraun und waren insbesondere im Bereich des Frakturspaltes festzustellen. Dunkelbraun gefärbtes Knorpelgewebe bildete sich vor allem im periostalen Kallus proximal und distal des Frakturspaltes aus. Angrenzend an die knorpeligen Areale war großflächig neu gebildetes Knochengewebe als schwarz gefärbte Geflechtknochentrabekel zu erkennen (Abb. 24).

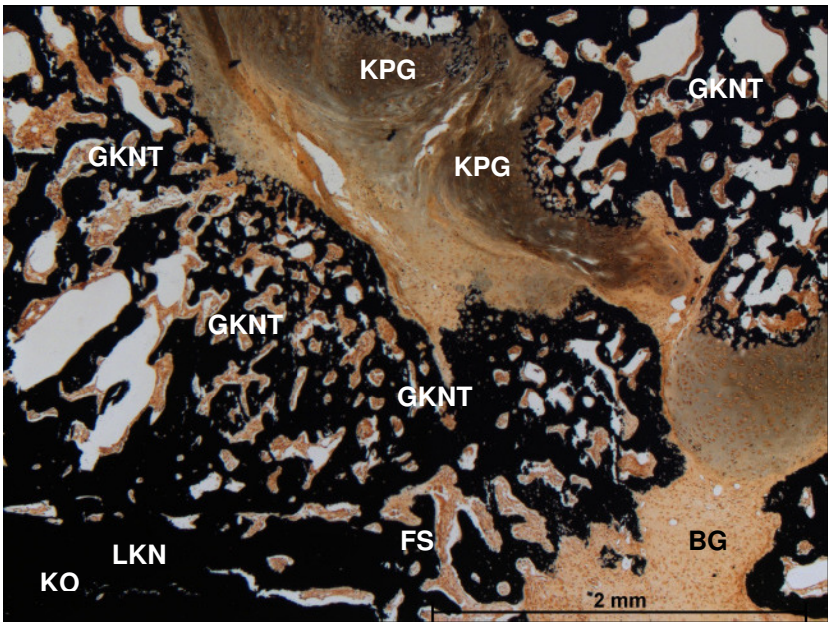


Abb. 24: Gewebezusammensetzung im Frakturkallus 28 Tage postoperativ
Exemplarisches histologisches Schnittpräparat einer Ratte der Gruppe II 28 Tage postoperativ
BG: Bindegewebe, FS: Frakturspalt, GKNT: Geflechtknochentrabekel, KO: Kortikalis, KPG: Knorpelgewebe, LKN: Lamellärer Knochen
Ausschnittsvergrößerung 5x, gefärbt nach von Kossa

In den Methylgrün/van Gieson gefärbten Schnittpräparaten wurde die Morphologie des Knorpel- und Knochengewebes näher betrachtet:

In den Knorpelinseln im periostalen Kallus waren massenhaft Chondrone festzustellen, die die funktionelle Baueinheit des Knorpelgewebes bilden. Ein Chondron umfasste in Gruppen zusammen gelagerte, blaugrün gefärbte knorpelbildende Chondrozyten, die von einem dunklen Knorpelhof umgeben waren. Zwischen den Chondronen ließ sich die schwächer angefärbte Interterritorialsubstanz erkennen (Abb. 25.1).

Neben der Analyse des Knorpelgewebes ließ sich in den Methylgrün/van Gieson gefärbten Schnittpräparaten die Morphologie des neu gebildeten Knochengewebes untersuchen. Dieses Knochengewebe entsprach Geflechtknochengewebe. Im Vergleich zu dem lamellären Knochengewebe der Kortikalis, dessen Lamellen gleichmäßig längs ausgerichtet waren, stellte sich das Geflechtknochengewebe weniger geordnet dar, und es ließ sich im Gegensatz zum Lamellenknochen eine höhere Anzahl von Osteozyten innerhalb des Geflechtknochengewebes identifizieren (Abb. 25.2).

Das aus Knorpelgewebe entstandene Geflechtknochengewebe bildete sich in Angrenzung an die Knorpelinseln aus. Damit war 28 Tage postoperativ die Heilungsphase der enchondralen Ossifikation erreicht (Abb. 25.3).

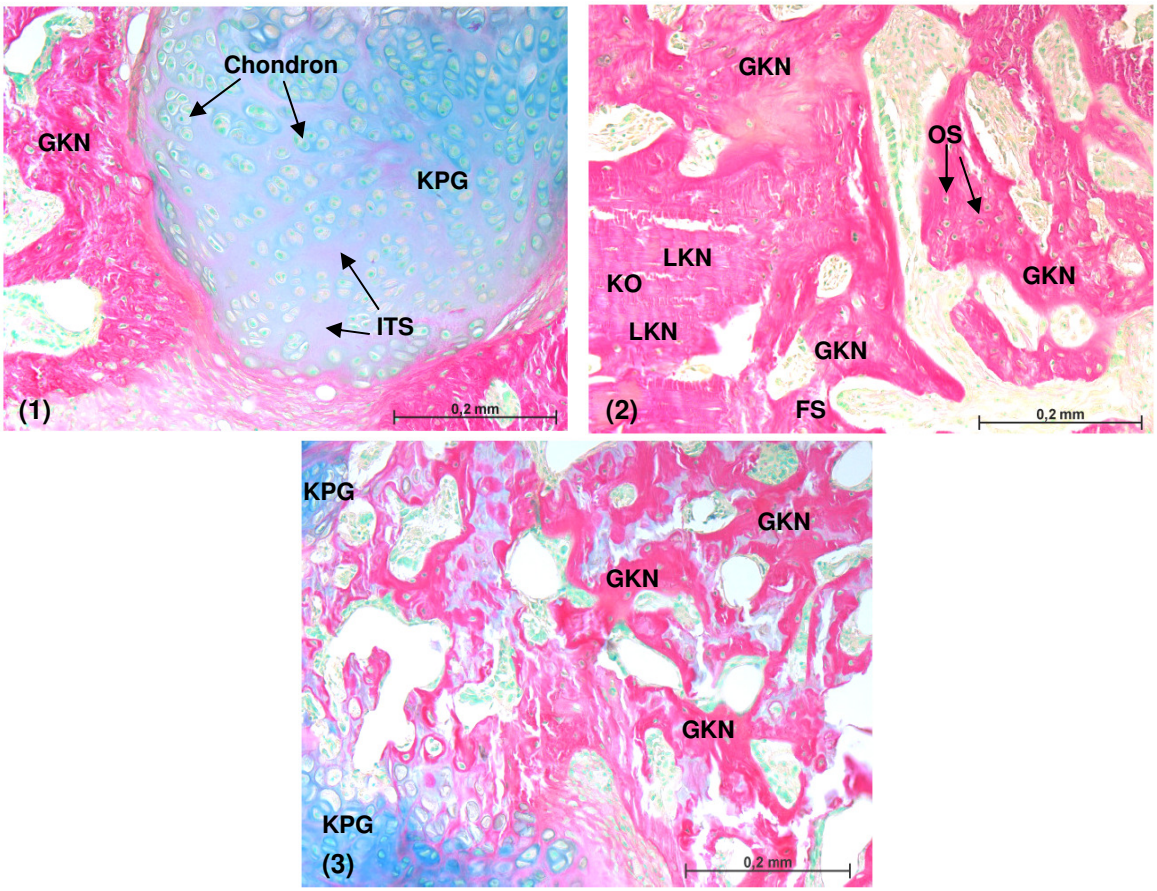


Abb. 25: Exemplarische histologische Schnittpräparate einer Ratte der Gruppe II 28 Tage postoperativ
FS: Frakturspalt, GKN: Geflechtknochen, ITS: Interritorialsubstanz, KO: Kortikalis, KPG: Knorpelgewebe, LKN: Lamellärer Knochen, OS: Osteozyten
Ausschnittsvergrößerung 20x, gefärbt nach Methylgrün/van Gieson

Insgesamt ergab die histomorphologische Begutachtung des Frakturkallus in allen Gruppen einen der Heilungsphase der enchondralen Ossifikation entsprechenden

Aufbau des Frakturkallus mit regelrechter geweblicher Zusammensetzung aus knorpeligen und knöchernen Bereichen.
In allen Gruppen zeigten sich keine hypertrophen Kallusreaktionen, keine osteolytischen Veränderungen und keine Anzeichen für Infektionen oder andere unerwünschte Wirkungen.

3.4.2 Histomorphometrie

Mittels der computergestützten histomorphometrischen Auswertung wurden in den histologischen Schnittpräparaten die Regionen des Frakturkallus (periostaler und endostaler Kallus sowie Gesamtkallus) und die Cortices sowie der Tibiadurchmesser getrennt quantitativ ausgewertet. Die mittels Bildanalyse erhobenen Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben und in tabellarischer Form dargestellt (Tab. 6-9).

Die Tibiadurchmesser waren in allen Gruppen näherungsweise gleich (Tab. 6).

Tab. 6: Histomorphom. Ergebnisse des Tibiadurchmessers im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

	Kontrolle	PDLLA	Simva low	Simva high	BMP-2
Ti.Dm [mm]	2,70 ± 0,17	2,61 ± 0,29	2,64 ± 0,18	2,76 ± 0,15	2,61 ± 0,17

Aufgrund der intramedullär implantierten Kirschnerdrähte war der endostale Kallus in allen Gruppen nur sehr gering ausgebildet, und es ergaben sich daher sehr geringe Messwerte. Für den periostalen Kallus und den Gesamtkallus zeigten sich deshalb auch nahezu analoge Ergebnisse (Tab. 7 und Tab. 8).
Die Fläche des periostalen Kallus und des Gesamtkallus war im Gruppenvergleich am größten in der Simvastatin high behandelten Gruppe (Tab. 7 und Tab. 8). Die knöchernen Flächen sowohl im periostalen als auch im Gesamtkallus waren am größten in der Simvastatin high behandelten Gruppe und in der Positivkontrollgruppe BMP-2. In der BMP-2-Gruppe wurde im Gruppenvergleich auch der höchste knöcherne Anteil am Frakturkallus bestimmt (Tab. 7 und Tab. 8). Die knorpeligen Flächen und die prozentualen knorpeligen Anteile am Frakturkallus waren im Gruppenvergleich am geringsten in der Simvastatin high behandelten Gruppe und in der Positivkontrollgruppe BMP-2, wobei sich nur in der BMP-2-Gruppe statistisch signifikante Unterschiede im Gruppenvergleich darstellten (Tab. 7 und Tab. 8). Für die Simvastatin low behandelte Gruppe wurde im Gruppenvergleich für

keinen der genannten Parameter deutliche Unterschiede zu den nicht behandelten Kontrolltieren festgestellt (Tab. 7 und Tab. 8).

Der prozentuale knöcherne Anteil der Kortikalis war statistisch signifikant geringer in der Simvastatin high behandelten Gruppe (Tab. 9).

Tab. 7: Histomorphom. Ergebnisse des periostalen Kallus im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

	Kontrolle	PDLLA	Simva low	Simva high	BMP-2
Ps.Cl.Ar [mm²]	12,94 ± 1,96	12,61 ± 4,93	12,52 ± 3,44	14,02 ± 4,23	12,11 ± 3,59
Ps.Cl.Ar/Ti.Dm [mm]	4,85 ± 0,98	4,91 ± 2,01	4,72 ± 1,15	5,14 ± 1,75	4,61 ± 1,16
Md.Ar.Ps.Cl [mm²]	7,50 ± 0,80	7,09 ± 1,83	7,27 ± 1,83	8,14 ± 2,02	8,20 ± 2,47
Md.Ar/Ps.Cl.Ar [%]	58,58 ± 6,09	59,26 ± 12,26	58,70 ± 7,08	60,78 ± 14,46	67,78 ± 5,58
Cg.Ar.Ps.Cl [mm²]	1,02 ± 0,48	0,75 ± 0,39	0,81 ± 0,43	0,75 ± 0,89	**0,23 ± 0,20***
Cg.Ar/Ps.Cl.Ar [%]	7,07 ± 3,08	5,55 ± 1,20	6,09 ± 2,12	4,43 ± 4,41	**1,82 ± 1,44#**

* vs. Kontrolle (p=0.002), PDLLA (p=0.002) und Simvastatin low (p=0.001) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)
\# vs. Kontrolle (p=0.003), PDLLA (p=0.001) und Simvastatin low (p=0.002) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)

Tab. 8: Histomorphom. Ergebnisse des Gesamtkallus im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

	Kontrolle	PDLLA	Simva low	Simva high	BMP-2
Cl.Ar [mm²]	15,32 ± 2,11	15,18 ± 4,90	14,91 ± 4,20	17,29 ± 4,45	14,50 ± 3,72
Md.Ar.Cl [mm²]	8,43 ± 0,87	8,00 ± 1,91	8,14 ± 2,17	9,28 ± 1,86	9,13 ± 2,64
Md.Ar/Cl.Ar [%]	55,41 ± 4,44	54,32 ± 9,27	55,24 ± 6,95	55,71 ± 12,31	62,96 ± 7,67
Cg.Ar.Cl [mm²]	1,02 ± 0,48	0,79 ± 0,39	0,84 ± 0,48	0,75 ± 0,89	**0,23 ± 0,19***
Cg.Ar/Cl.Ar [%]	6,41 ± 2,83	5,19 ± 1,15	5,77 ± 2,23	4,09 ± 4,24	**1,66 ± 1,24#**

* vs. Kontrolle (p=0.003), PDLLA (p=0.001) und Simvastatin low (p=0.001) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)
\# vs. Kontrolle (p=0.003), PDLLA (p=0.000) und Simvastatin low (p=0.001) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)

Tab. 9: Histomorphom. Ergebnisse der Kortikalis im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ

	Kontrolle	PDLLA	Simva low	Simva high	BMP-2
Md.Ar/Ct.Ar [%]	98,61 ± 0,65	98,02 ± 0,94	96,93 ± 1,77	**97,22 ± 1,05***	97,98 ± 1,04

* vs. Kontrolle (p=0.004) (nach Bonferroni-Holm-Korrektur)

4 Diskussion

Knochenheilungsstörungen sind mit den bisher etablierten Verfahren nicht immer zufriedenstellend therapierbar. Ein vielversprechender Lösungsansatz stellt die Applikation von heilungsstimulierenden Wirkstoffen dar. BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) gelten aktuell als potenteste heilungsstimulierende Substanzen für die Frakturheilung. Die BMPs haben jedoch eine eingeschränkte Zulassung und aufgrund der hohen Kosten, die unter anderem mit ihrer Herstellung verbunden sind, kommt es nur zu einer begrenzten klinischen Anwendung. Alternativen könnten etablierte Substanzen sein, die einen pleiotropen knochenanabolen Effekt haben. Statine sind hinlänglich als cholesterinsenkende Medikamente bekannt und ihnen werden in aktuellen Studien vermehrt knochenanabole Effekte zugeschrieben. Insofern könnten sich Statine als eine Alternative zu den bereits zugelassenen kostenträchtigen BMPs herausstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss eines Statins, Simvastatin, unter lokaler Freisetzung von PDLLA beschichteten Kirschnerdrähten auf die Heilung der Tibiafraktur zu untersuchen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Dosierungen sollten Erkenntnisse über eventuelle dosisabhängige Wirkungen von Simvastatin gewonnen werden. Neben dem Vergleich zu nicht behandelten Tieren wurden die Wirkungen auch mit denen des Wachstumsfaktors BMP-2 verglichen. Für die Zielstellungen wurde Ratten unter standardisierten Versuchsbedingungen die rechte Tibia und Fibula frakturiert. Die Tibiafrakturen wurden mit unbeschichteten oder mit Simvastatin oder mit BMP-2 beschichteten Kirschnerdrähten intramedullär stabilisiert. Zur klinischen Verlaufskontrolle erfolgten regelmäßige Körpergewichts- und Körpertemperaturmessungen der Versuchstiere sowie Röntgenaufnahmen in konventioneller Technik. Nach einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen wurden die Tiere getötet und im Anschluss radiologische, biomechanische sowie histomorphologische und histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt.

4.1 Ergebnisse

Die vorliegenden biomechanischen, radiologischen und histomorphometrischen Ergebnisse lassen erkennen, dass 50 µg lokal appliziertes Simvastatin einen stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur bei Ratten hat.

Biomechanisch war ein deutlicher Einfluss durch die lokale Simvastatin-Applikation festzustellen. Die Tibiae der Simvastatin high behandelten Tiere wiesen eine nahezu doppelt so hohe torsionale Steifigkeit und ein signifikant gesteigertes maximales Drehmoment im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren auf. Diese Ergebnisse sprechen für eine gesteigerte Stabilität der Frakturkallusse der Simvastatin high behandelten Tiere, die wahrscheinlich durch eine stimulierte Kallusreifung begründet ist. Die Analyse der biomechanischen Ergebnisse ließ auch eine Dosisabhängigkeit der Wirkungen von Simvastatin erkennen, denn bei den Simvastatin low (3 µg) behandelten Tieren war biomechanisch nahezu kein Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur festzustellen.

Die radiologische Auswertung mittels Röntgenscore bestätigte einen dosisabhängig stimulierenden Einfluss durch lokal appliziertes Simvastatin. Die Tibiae der Simvastatin high behandelten Tiere wiesen eine weiter fortgeschrittene Frakturkonsolidierung als die Tibiae der unbehandelten Kontrollgruppe auf. Diese verstärkte Frakturkonsolidierung spricht analog den biomechanischen Resultaten für eine Stimulierung der Heilung durch lokal appliziertes Simvastatin high und könnte auf einer gesteigerten Durchbauung des Frakturkallus beruhen.

Die histomorphometrischen Ergebnisse stützen die Hypothese einer Stimulierung der Kallusreifung durch lokal appliziertes Simvastatin. Die Simvastatin high behandelten Tiere wiesen im Frakturkallus weniger Knorpel als die unbehandelten Kontrolltiere auf, was als Ausdruck eines beschleunigten Umbaus des Frakturkallus in der Heilungsphase der enchondralen Ossifikation interpretiert werden kann. Ein möglicher Einfluss von Simvastatin auf die Kortikalismineralisierung durch lokal appliziertes Simvastatin high könnte der ermittelte Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe sein.

Zusammenfassend lassen die gesteigerte mechanische Stabilität, die verstärkte Frakturkonsolidierung und der erhöhte Knorpelabbau den Schluss zu, dass der heilungsstimulierende Einfluss von lokal appliziertem Simvastatin durch eine Stimulierung der Kallusreifung realisiert wurde.

Bei der Positivkontrollgruppe BMP-2 fielen die Ergebnisse ähnlich denen der Simvastatin high behandelten Gruppe aus. Die Tibiae der Positivkontrolle waren radiologisch weiter konsolidiert, wiesen signifikant gesteigerte mechanische Eigenschaften und einen signifikant verringerten Knorpelanteil im Frakturkallus auf. Für die Positivkontrollgruppe BMP-2 wurden heilungsstimulierende Wirkungen durch

verschiedene tierexperimentelle Studien zur Knochen- und Frakturheilung erschöpfend belegt [21,22,36], was zur klinischen Einführung von BMP-2 führte. Die Wirkungen von Simvastatin am Knochengewebe betreffend, zeigten die Ergebnisse verschiedener in vitro-Studien, dass Simvastatin und andere Statine die besondere Eigenschaft der Stimulation der endogenen Synthese von BMP-2 besitzen. Statine stimulierten die Expression von BMP-2 in osteoblastären Vorläuferzelllinien [74,75] sowie Osteoblasten [23,72]. Im Verlauf der Frakturheilung werden mesenchymale Stammzellen angelockt, und im weiteren Voranschreiten der Heilung differenzieren osteoblastäre Progenitorzellen zu Osteoblasten. Für die vorliegende Arbeit wird daher angenommen, dass die Ratten einer vermehrten endogenen BMP-2-Synthese unter Simvastatin ausgesetzt waren und dies die Ursache für die stimulierenden Wirkungen von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur war.
Der zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismus für die vermehrte BMP-2-Produktion unter Statinen ist bisher nicht abschließend aufgeklärt. Statine unterbrechen durch Inhibition der HMG-CoA-Reduktase den zellulären Mevalonatweg und inhibieren dadurch die Bildung von Isoprenoiden, die verschiedene Signalmoleküle prenylieren. Der Eingriff in den zellulären Mevalonatweg und die unterbundene Proteinprenylierung wird als Grundlage der vermehrten BMP-2-Expression unter Statinen vermutet [63,72]. Die Wirkungen von Statinen auf das Knochengewebe werden aber möglicherweise nicht allein durch die BMP-2-Stimulation vermittelt. Auch die stickstofftragenden Bisphosphonate (N-BPs) interferieren mit dem Mevalonatweg, wobei diese Substanzen primär die osteoklastäre Knochenresorption inhibieren [46,47,48]. Diese Wirkung entfalten N-BPs durch eine Interaktion mit dem Mevalonatweg mehr downstream als die Statine [44,45]. Da sowohl Bisphosphonate als auch Statine in den Mevalonatweg eingreifen, sind auch Statin vermittelte Wirkungen an knochenabbauenden Osteoklasten denkbar. In einer in vitro-Studie von Grasser et al. wiesen die Autoren osteoklastenhemmende Wirkungen der Statine nach [97]. Auch in einer tierexperimentellen Studie wurde nach widersprüchlichen Ergebnissen postuliert, dass Statine nicht nur auf Osteoblasten, sondern auch auf Osteoklasten wirken [98]. Zusätzliche Wirkungen an Osteoklasten könnten eine mögliche Erklärung für die diskrete Abnahme der Kortikalismineralisierung in der vorliegenden Arbeit sein. Im Kallus zeigte sich dieser Effekt jedoch zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht, da die Mineralisierung vergleichbar der Kontrollgruppe war. Aus den vorliegenden Ergebnissen ist daher in erster Linie abzu-

leiten, dass knochenanabole Effekte die primäre Hauptwirkung von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur darstellten.

4.2 Gegenüberstellung zu anderen Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur unter Verwendung einer lokalen Applikationsmethode untersucht. Analog der vorliegenden Arbeit wurden heilungsstimulierende Wirkungen von lokal appliziertem Simvastatin auch bereits in anderen tierexperimentellen Untersuchungen zur Knochen- [88,89] und Frakturheilung [90-92] beschrieben. In den bisher veröffentlichten Studien zur Wirkung von lokal appliziertem Simvastatin auf die Frakturheilung wurden verschiedene Höhen der Dosierung und andere Applikationstechniken angewandt. Serin-Kilicoglu und Wang et al. wählten die Methode von Mundy et al. [23] und applizierten Simvastatin per injectionem subkutan über der Fraktur bei Ratten [90,91]. Serin-Kilicoglu stellte nach drei Wochen eine histologisch beschleunigte Frakturheilung der Simvastatin behandelten Tiere fest [90]. In dieser Studie war die Dosierung im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit um den Faktor 25 oder 50 größer. Serin-Kilicoglu injizierte entweder 5 oder 10 mg/kg/d Simvastatin über fünf Tage einmal täglich [90]. Bezogen auf eine mg/kg-Basis wurden in der vorliegenden Arbeit nur einmalig 0,2 mg/kg Simvastatin high appliziert. Wird die eingesetzte Simvastatin high-Dosierung von 0,05 mg auf ein durchschnittliches Körpergewicht der Ratten von 0,25 kg bezogen, resultieren 0,2 mg/kg. Eine breiter angelegte Studie als die genannte von Serin-Kilicoglu führten Wang et al. durch und stellten eine sowohl biomechanisch als auch histomorphometrisch und radiologisch stimulierte Frakturheilung bei Ratten fest [91]. Auch in dieser Studie war die Dosierung höher als in der vorliegenden Arbeit (10 mg/kg/d versus 0,2 mg/kg). Neben der höheren Dosis ist die Applikationsmethode von Serin-Kilicoglu und Wang et al. als weniger günstig einzuschätzen. Tägliche subkutane Injektionen werden nicht von allen Patienten toleriert. Sie können Schmerzen verursachen und zusätzliche Probleme wie Überempfindlichkeitsreaktionen oder Infektionen an der Einstichstelle hervorrufen.

Skoglund und Aspenberg wählten eine andere Methode zur lokalen Applikation von Simvastatin. Mäusen wurde subkutan eine Minipumpe implantiert und Simvastatin kontinuierlich über der Fraktur freigesetzt. Unter dieser Applikationstech-

nik erreichten Skoglund und Aspenberg eine Beschleunigung der Frakturheilung [92]. Über die Pumpe wurden über 14 Tage alle 24 Stunden 0,1 mg/kg Simvastatin freigesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden einmalig 0,2 mg/kg Simvastatin in das PDLLA eingearbeitet und die gesamte Menge von den intramedullär implantierten Kirschnerdrähten über 28 Tage lokal an der Tibiafraktur appliziert. Auch unter Verwendung eines Pumpensystems sind analog den Arbeiten von Wang et al. und Serin-Kilicoglu Risiken wie Infektionen und Überempfindlichkeitsreaktionen nicht auszuschließen. Darüber hinaus birgt dieses System zusätzliche Probleme wie das Verstopfen der zuführenden Kanülen und die mögliche sekundäre Dislokation der Pumpe. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Patienten die Implantation eines Pumpensystems zur Frakturbehandlung tolerieren würden. Die Applikation von heilungsstimulierenden Substanzen mittels Injektionstechniken oder Minipumpen ist zudem nur unzureichend steuerbar. Es besteht das Risiko, dass die Substanzen unkontrolliert vom Wirkort abdiffundieren. Dadurch sind zusätzliche systemische Nebenwirkungen nicht auszuschließen.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit zeigten die bisher publizierten tierexperimentellen Studien, dass Statine bei lokaler Applikation die Frakturheilung stimulieren [90-92]. Aber sie verwendeten für den späteren klinischen Einsatz weniger komfortable Applikationsmethoden und/oder sehr hohe Dosierungen. Diese waren nicht nur höher als in der vorliegenden Arbeit, sondern übertrafen auch die Standardhumandosis zur Therapie der Hypercholesterinämie (20-40 mg/d Simvastatin) [64]. Die Gabe von 20 mg Simvastatin entspricht bei einem 70 kg schweren Menschen einer Dosis von 0,29 mg/kg/d. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich zu den publizierten tierexperimentellen Studien eine effektive Dosisreduktion erreicht. Sie lag unter der Humandosis, und in dieser Dosierung waren auch heilungsstimulierende Wirkungen von Simvastatin festzustellen.

Neben der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode der lokalen Applikation wurden Statinwirkungen auf das Knochengewebe auch unter systemischer Applikation untersucht. Skoglund et al. induzierten Mäusen eine Femurfraktur, fütterten sie mit Simvastatin in einer Dosis von 120 mg/kg/d und ermittelten gesteigerte mechanische Eigenschaften der Simvastatin behandelten Tiere [99]. Von Knoch et al. zeigten mit dieser Applikationsform und Dosierung auch eine gesteigerte Knochenneubildung in einem Osteolysemodell der Maus [100]. Die eingesetzte Dosis von 120 mg/kg/d war um ein Vielfaches höher als in der vorliegenden Arbeit und

würde einer Humandosis von 8.400 mg/d (versus 20-40 mg/d Standarddosis) entsprechen. Eine solche Dosierung könnte lebensbedrohliche Nebenwirkungen wie Leberversagen, Rhabdomyolyse oder Nierenversagen zur Folge haben. Im Gegensatz zu Skoglund et al. und von Knoch et al. sind die Ergebnisse anderer Studien unter oral-systemischer Statinapplikation nicht immer einheitlich [76-86]. Diese Studien untersuchten die Wirkung von Statinen an intaktem Knochengewebe unter der Fragestellung eines möglichen Einsatzes von Statinen in der Osteoporosetherapie und untersuchten dafür den Einfluss von Statinen auf die Knochendichte sowie auf das Frakturrisiko von Patienten. Die Datenlage zur Knochendichte stellt sich nicht immer einheitlich dar. Es wurden sowohl positive Effekte [76,77] als auch eine fehlende Korrelation zwischen Statineinnahme und Höhe der Knochendichte festgestellt [84-86], während eine große Metaanalyse aus dem Jahr 2007 wiederum eine signifikant höhere Knochendichte bei Patienten unter Statintherapie nachwies [78]. Die publizierten Studien zum Einfluss von Statinen auf das Frakturrisiko beschrieben in der Mehrzahl einen protektiven Effekt von Statinen [79-82], während zwei Metaanalysen zu gegensätzlichen Schlussfolgerungen kamen [101,102]. Die Interpretation der Daten zur Knochendichte und zum Frakturrisiko wird aber durch eine Reihe von Einflussfaktoren erschwert. Die eingeschlossenen Probanden unterschieden sich in Alter, Geschlecht, Körpergewicht, allgemeinen Risikofaktoren wie Alkohol- und Nikotinabusus und Begleiterkrankungen. Zudem waren die Beobachtungszeiträume verschieden lang gewählt. Deshalb sind Erkenntnisse über einen eventuell zeitabhängigen knochenanabolen Effekt der Statine aus diesen Studien nur schwer abzuleiten. Neben der heterogenen Studienpopulation und den unterschiedlich langen Beobachtungszeiträumen könnte auch die Wahl des eingesetzten Statins Grundlage der widersprüchlichen Ergebnisse sein. Für Pravastatin wurde im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Simvastatin kein BMP stimulierender Effekt in vitro nachgewiesen [103]. Eine wesentliche Limitation aller publizierten Studien ist das heterogene Design. Die überwiegende Mehrzahl war nicht kontrolliert prospektiv randomisiert. Weil auch große Metaanalysen nur unbefriedigend zur Klärung knochenanaboler Effekte von Statinen beitragen, führten Patil et al. die erste prospektiv randomisierte, placebokontrollierte Studie zum Einfluss von Simvastatin auf die Frakturheilung und auf die Knochendichte durch. 62 Patienten mit distaler Radiusfraktur erhielten entweder 20 mg/d Simvastatin oral oder Placebo. Nach 12 Wochen wurde für beide

Gruppen weder ein Unterschied im radiologisch fassbaren Heilungsgrad noch in der Höhe der Knochendichte oder der Knochenmarker festgestellt [104]. Hinsichtlich möglicher Auswirkungen auf die Knochendichte ist aber der Studienzeitraum zu kurz und die Studienpopulation insgesamt zu klein gewählt, um einen Zusammenhang zwischen Statineinnahme und Frakturheilung sicher beurteilen zu können. Entgegen der vorliegenden Arbeit konnten Patil et al. demnach keine stimulierenden Wirkungen von Simvastatin auf die Frakturheilung nachweisen. Auch die anderen klinischen Studien tragen durch ihr heterogenes Design und ihre vielfältigen Limitationen nur unbefriedigend zur Klärung Knochen wirksamer Statineffekte bei. Die bisher veröffentlichen klinischen Studien stehen damit im Widerspruch zu den vorliegenden Ergebnissen und zu Ergebnissen aus in vitro- sowie in vivo-Untersuchungen. Diese belegten, dass Statine knochenanabol sind [23,72,74,75,87,89,100]. Die Statine wurden in allen klinischen Untersuchungen nur oral/systemisch verabreicht, während Simvastatin in der vorliegenden Arbeit lokal an der Tibiafraktur appliziert wurde. Zudem wurden die Statine in den klinischen Studien nur in Dosierungen verabreicht, welche für die cholesterinsenkende Wirkung klinisch etabliert sind. Möglicherweise ist eine Steigerung der Dosierung notwendig, um unter systemischer Applikation Wirkungen auf das Knochengewebe zu erzielen. Diese Hypothese wird durch die genannte tierexperimentelle Untersuchung von Skoglund et al. gestützt, die wie bereits an anderer Stelle erläutert, unter einer exzessiv hohen systemischen Dosis von Simvastatin eine beschleunigte Frakturheilung bei Mäusen beobachteten [99]. Es lässt sich demnach vermuten, dass insbesondere Dosierung und Applikationsform der Statine Grundlage der nicht einheitlichen Ergebnisse der klinischen Studien sind. Eine wahrscheinliche Begründung ist der First-pass-Effekt der Statine. Statine wurden für ihre Hauptwirkung als Cholesterinsenker als selektiv im Hepatozyten wirkende Substanzen entwickelt. Deshalb unterliegen sie bei oraler Applikation einer hohen präsystemischen Elimination, so dass weniger als 5% die systemische Zirkulation erreichen [61]. Die Bedeutung des First-pass-Effekts erkannten Gutierrez et al. und applizierten Statine transdermal, wodurch sie die Frakturheilung bei Ratten stimulieren konnten [105]. In einem anderen Versuch mit der gleichen Applikationstechnik wurde die Knochenneubildung bei Ratten um 150% gesteigert. In dieser Studie konnten Gutierrez et al. zudem nachweisen, dass die Konzentration an Statin im Blut nach transdermaler Applikation wesentlich länger persistierte als nach oraler

Statingabe [87]. Sowohl klinische als auch experimentelle Daten weisen demnach darauf hin, dass die systemische Applikation von Statinen maßgeblich durch den First-pass-Effekt beeinflusst wird. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten stimulierenden Wirkungen von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur stützen die Hypothese, dass es für die Nutzbarmachung knochenanaboler Statineffekte notwendig ist, Statine lokal am Wirkort zu applizieren, um durch Umgehung des Statin spezifischen First-pass-Effekts eine hohe Verfügbarkeit im Knochengewebe zu erreichen.

4.3 Poly [D,L-Laktid]-Beschichtung

Um eine hohe lokale Konzentration an Simvastatin direkt am Knochengewebe, an der Fraktur, zu gewährleisten und gleichzeitig eine frakturferne, unkontrollierte Freisetzung auszuschließen, wurde Simvastatin in der vorliegenden Arbeit in das Trägermaterial PDLLA eingearbeitet. In PDLLA eingearbeitet, wurde Simvastatin auf Titankirschnerdrähte aufgetragen und von diesen über den Behandlungszeitraum von 28 Tagen direkt an der Tibiafraktur freigesetzt.

An Trägermaterialien werden grundsätzlich verschiedene Anforderungen gestellt. Bedeutsam ist die kontrolliert gleichmäßige Freisetzung der eingearbeiteten Substanzen über den gesamten Heilungszeitraum. Durch PDLLA wird diese Anforderung gut erfüllt. In PDLLA eingearbeitete Wirksubstanzen unterliegen nach einem initialen Peak innerhalb von 48 Stunden einer kontinuierlichen Freisetzung über sechs Wochen [93]. Neben der kontrollierten Freisetzung ist es auch wichtig, dass Trägermaterialen mechanischen Belastungen standhalten, die bei der operativen Insertion von Osteosynthesematerialen entstehen. Diese Anforderung wird von der PDLLA-Beschichtung ebenfalls erfüllt. In vitro- und in vivo-Untersuchungen zeigten, dass es dem Abrieb bei einem Verlust von nur fünf Prozent an Beschichtungsmaterial sehr gut standhält [93]. Neben kontrollierter Freisetzung und hoher mechanischer Stabilität dürfen Trägermaterialien die Wirksamkeit der eingearbeiteten Substanzen nicht beeinträchtigen und selbst keine Nebenwirkungen hervorrufen. Verschiedene Autoren haben Trägermaterialien für Statine beschrieben. Bisher wurden Kollagenschwämme [88,89], Methylzellulosegel [106] und Kalziumsulfat [107] erprobt. Bei allen drei Trägermaterialien wurde unter dem Einfluss von Statinen eine vermehrte Knochenneubildung festgestellt. Sowohl unter dem Einsatz

von Methylzellulose als auch Kalziumsulfat traten aber deutliche inflammatorische Reaktionen auf. In der vorliegenden Arbeit waren weder klinisch noch histologisch, radiologisch oder biomechanisch Anzeichen für negative Wirkungen der Beschichtung festzustellen. Auch in anderen Studien unter Einsatz der PDLLA-Beschichtung traten zu keiner Zeit Anzeichen für Fremdkörperreaktionen oder andere Nebenwirkungen auf [18,21,50]. Die Risiken systemischer oder lokaler Nebenwirkungen sind bei der Verwendung von PDLLA deshalb stark reduziert, weil es einem vollständig biologischen Abbau durch Hydrolyse unterliegt. So können langfristig keine potenziell schädlichen Metabolite in der Zirkulation persistieren.
Die genannten Vorteile der PDLLA-Beschichtung begründen ihre bereits erfolgreiche klinische Anwendung zur Antibiotikaprophylaxe [108].

4.4 Tiermodell

Für die Bewertung des Einflusses von Simvastatin auf die Heilung von Frakturen ist neben der geeigneten Applikationstechnik und Dosierung ein standardisiertes Tiermodell notwendig. Nur so kann der Effekt von Simvastatin auf die Heilung sicher eingeschätzt werden. Als Versuchstiere wurden in der vorliegenden Arbeit adulte, weibliche Spraque Dawley Ratten verwendet. Ratten wurden bereits mehrfach als Versuchstiere in experimentellen Untersuchungen zur Frakturheilung genutzt. Deshalb liegen hinreichende Daten vor, die einen aussagefähigen Vergleich ermöglichen [18,21,22,50,90,91,105]. Fraglich bleibt, inwieweit Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen auf den Menschen extrapoliert werden können. Dies ist mit Ratten teilweise möglich. Unter anderem stellte Thomas Einhorn fest, dass Ratten eine dem Menschen verwandte Frakturheilung aufweisen, die aber rascher erfolgt [109].
Neben der geeigneten Versuchstierart muss in Studien zum Einfluss von Wirksubstanzen auf die Frakturheilung eine standardisierte Frakturinduktion erfolgen. In anderen tierexperimentellen Untersuchungen zur Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung wurden die Frakturen mit Zangen [92,99] oder rein manuell induziert [90]. Bei beiden Methoden sind die geforderten standardisierten Frakturen kaum zu erzielen. Standardisierte Frakturen sind aber neben der geeigneten Versuchstierart die wesentliche Voraussetzung, um auf der Grundlage eines vergleichbaren Kollektivs den Einfluss der eingesetzten Wirksubstanz sicher beurtei-

len zu können. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit das von Schmidmaier et al. entwickelte Frakturmodell verwendet [94]. In der vorliegenden Arbeit wurde in 91% der Fälle der geforderte Frakturtyp AO 42-A2/A3 induziert, während nur in neun Prozent der Fälle der Frakturtyp AO 42-B erzeugt wurde. In fünf Prozent der Fälle wurde eine komplizierte Mehrfragmentfraktur festgestellt. Diese Tiere erfüllten nicht die Versuchskriterien und wurden daher von der Studie ausgeschlossen.
In einer Untersuchung zur Wirkung von Lovastatin auf die Frakturheilung verwendete eine Arbeitsgruppe das von Bonnarens und Einhorn entwickelte Frakturmodell [105]. Nach Bonnarens und Einhorn wird zuerst ein Steinmann-Pin retrograd in das Rattenfemur eingebracht und nachfolgend die Fraktur gesetzt [110]. Dieses Modell ist den Verfahren mit Zangen oder manueller Fraktursetzung vorzuziehen, denn analog dem Modell von Schmidmaier et al. werden standardisierte Frakturen erzeugt. Die Vorgehensweise der sekundären Frakturinduktion birgt aber das Risiko, den implantierten Steinmann-Pin zu beschädigen. Dies könnte eine Fehlstellung der Frakturenden und eine Beeinträchtigung der Heilung zur Folge haben. Das von Schmidmaier et al. entwickelte Frakturmodell eliminiert die Schwächen des Modells von Bonnarens und Einhorn. Um das Risiko der Fehlheilung durch ein beschädigtes Implantat auszuschließen, erfolgt zuerst die Frakturinduktion und danach wird die Tibia intramedullär mittels Kirschnerdraht stabilisiert.

4.5 Simvastatin versus BMP-2

In der vorliegenden Arbeit sollte neben der Untersuchung des Einflusses von Simvastatin auf die Heilung der Tibiafraktur auch ein Vergleich mit den Wirkungen des gut erforschten, heilungsstimulierenden Wachstumsfaktors BMP-2 durchgeführt werden. Simvastatin ist ein Vertreter der Statine, die bisher als cholesterinsenkende Medikamente verwendet werden. Gleichzeitig besitzen Simvastatin und andere Statine die besondere Eigenschaft der Entfaltung pleiotroper knochenanaboler Effekte, indem sie die BMP-2-Synthese in Osteoblasten stimulieren [23,72]. Deshalb stellt sich die Frage, ob die Anwendung von Simvastatin in einer Dosierung von 50 µg vergleichbare Effekte auf die Heilung der Tibiafraktur hat wie 50 µg exogen appliziertes BMP-2. Die Dosierung von 50 µg hatte sich in einer anderen tierexperimentellen Studie als optimal für BMP-2 zur Stimulierung der Frakturheilung bei Ratten erwiesen [21]. Wie nicht anders zu erwarten, waren analog dieser Studie

heilungsstimulierende Effekte von BMP-2 in der vorliegenden Arbeit festzustellen. Im direkten Vergleich zwischen den Simvastatin high und den BMP-2 behandelten Tieren war festzustellen, dass die Simvastatin behandelten Tiere in Teilen, insgesamt aber nicht ganz der gleichen Heilungsstimulierung wie BMP-2 behandelte Tiere unterlagen. Dies deutet darauf hin, dass die BMP-2 behandelten Tiere weiter in ihrer Heilung vorangeschritten waren. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass BMP-2 bei Anwendung von Simvastatin zuerst über einen bestimmten Zeitraum endogen produziert werden muss. Bei exogener Applikation von BMP-2 liegt es unmittelbar nach Frakturstabilisierung vor. Dieser Hypothese scheinen die Ergebnisse aus der Dissertation von Herrn Dr. med. Moritz Morawski zu entsprechen. Im Rahmen des gemeinsamen Versuchsvorhabens untersuchte Herr Dr. med. Moritz Morawski den Einfluss von Simvastatin von PDLLA beschichteten Kirschnerdrähten auf die Frakturheilung bei Ratten nach 42 Tagen. Nach diesem längeren Untersuchungszeitraum waren biomechanisch, radiologisch und histologisch-histomorphometrisch stärkere stimulierende Wirkungen von 50µg lokal appliziertem Simvastatin nachweisbar. Die stimulierenden Wirkungen von Simvastatin high hatten sich denen von BMP-2 angeglichen. Bemerkenswerterweise schienen die Simvastatin high behandelten Tiere einem schnelleren Remodeling unterworfen zu sein als die BMP-Tiere. Zusätzlich war nach 42 Tagen keine abnehmende Kortikalismineralisierung mehr festzustellen. Heilungsstimulierende Wirkungen von Simvastatin scheinen demnach über einen längeren Behandlungszeitraum zuzunehmen. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage nach zeitabhängigen Wirkungen von Simvastatin auf die Frakturheilung. Zur Beantwortung dieser Frage ist es wichtig, den Zeitpunkt der erstmals einsetzenden BMP-2-Expression unter Statinen zu ermitteln. Bisherige Arbeiten liefern hierzu nur indirekte Anhaltspunkte. Von Mundy et al. wurden knochenanabole Wirkungen durch Statine bereits nach fünf Tagen beschrieben [23]. Wang et al. sowie Skoglund und Aspenberg ermittelten stimulierende Wirkungen auf die Frakturheilung nach zwei [91,92] und Serin- Klicoglu nach drei Wochen [90]. Diese tierexperimentellen Untersuchungen deuten auf eine früh einsetzende Expression von BMP-2 unter Statinen hin. Es lässt sich aber nicht ableiten, wie die BMP-2-Synthese über die gesamte Heilung verläuft. Die vorliegenden Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen nach 42 Tagen (nicht Teil dieser Dissertation) machen aber eine zeitab-

hängig heilungsstimulierende Wirkung von Simvastatin auf die Frakturheilung sehr wahrscheinlich.
Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Ergebnissen nach 42 Tagen (nicht Teil dieser Dissertation) führt zu folgenden abschließenden Schlussfolgerungen:

1. Das Statin Simvastatin stimuliert die Heilung der Tibiafraktur bei Ratten.
2. Die Einarbeitung von Simvastatin in eine PDLLA-Beschichtung ist eine effektive Methode, um die knochenanabolen Wirkungen der Statine für die Frakturheilung nutzbar zu machen.
3. Die heilungsstimulierenden Wirkungen von Simvastatin unterliegen einer zeitabhängigen Wirkungsbeziehung.
4. Simvastatin führt bei identischer Dosierung nach einem längeren Behandlungszeitraum als in der vorliegenden Arbeit zu gleichen heilungsstimulierenden Effekten wie der etablierte Wachstumsfaktor BMP-2.
5. Die im Abschnitt 1.6.2 der vorliegenden Arbeit formulierte Hypothese lässt sich bestätigen. Das Statin Simvastatin hat unter lokaler Freisetzung von Poly[D,L-Laktid] beschichteten Kirschnerdrähten einen dosisabhängig stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur von Ratten.

4.6 Ausblick

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation hat das bisher klinisch vornehmlich als cholesterinsenkendes Medikament bekannte Statin Simvastatin einen stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur bei Ratten. Wünschenswert wären deshalb weiterführende Untersuchungen an Ratten unterschiedlichen Geschlechts und Alters sowie an Großtieren, um diese Wirkung bei verschiedenen Kollektiven überzeugend zu bestätigen und damit ein neues Indikationsfeld für Statine zu eröffnen.
Die Dissertation wirft folgende Fragen auf, für die bis dato keine schlüssigen Antworten zur Verfügung stehen:

1. Wann setzt die Heilungsstimulierung unter Simvastatin und anderen Statinen ein und wie ist die Kinetik über den Heilungsverlauf?

2. Entfalten Statine neben ihren besonderen pleiotropen Effekten auch Wirkungen auf Osteoklasten in vivo?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollten weiterführende immunhistochemische und in vitro-Untersuchungen erfolgen.

Die in dieser Dissertation vorgestellte Technik der Beschichtung von Osteosynthesesystemen hat sich als eine effektive Applikationsmethode für das Statin Simvastatin erwiesen. Mit dieser Applikationstechnik könnten die Statine auch beim Menschen angewendet werden, denn sie ist sehr komfortabel für Patienten. Zusätzliche Eingriffe zur Applikation der Wirksubstanzen sind nicht mehr notwendig. Die Beschichtung von Osteosynthesesystemen mit heilungsstimulierenden Substanzen ermöglicht eine effektive Beeinflussung von Knochenheilungsstörungen, wodurch die Morbidität komplexer operativer Eingriffe reduziert wird.
Die besondere Eigenschaft von Statinen, die BMP-2-Synthese zu stimulieren, stellt eine neue Möglichkeit zur pharmakologischen Beeinflussung von Knochen- und Frakturheilungsstörungen dar. Die Statine werden seit vielen Jahren erfolgreich als Cholesterinsenker eingesetzt. Mögliche Nebenwirkungen dieser Medikamentengruppe sind hinlänglich bekannt, insofern stellen sie eine vielversprechende Alternative zu den bereits zugelassenen, aber kostenintensiven BMPs für die erfolgreiche Beeinflussung von Knochenheilungsstörungen dar.
Um die BMP stimulierenden Wirkungen von Simvastatin und anderen Statinen noch gezielter zur positiven Beeinflussung der Knochen- und Frakturheilung nutzbar machen zu können, sollte die Entwicklung von knochenspezifischen Statinen durch die traumatologisch-orthopädische Forschung vorangetrieben werden.

5 Zusammenfassung

Knochen- und Frakturheilungsstörungen verursachen trotz moderner Behandlungstechniken oft lange Leidenswege und große Einschränkungen der Lebensqualität betroffener Patienten. Deshalb ist es ein Ziel der traumatologisch-orthopädischen Forschung, durch neue Therapien Knochenheilungsstörungen erfolgreich zu beeinflussen. Heute stellt die therapeutische Applikation von Wachstumsfaktoren eine Möglichkeit der positiven Beeinflussung von Knochenheilungsstörungen dar. BMP-2 und BMP-7 sind gegenwärtig die effektivsten Wachstumsfaktoren und mit eingeschränkter Indikation für die Behandlung von Knochen- und Frakturheilungsstörungen bereits zugelassen. Als negative Begleiterscheinungen gelten hohe Kosten und die noch nicht endgültig beantwortete Frage nach den Nebenwirkungen.

In verschiedenen experimentellen und klinischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die erfolgreich als Cholesterinsenker eingesetzten Statine die besondere Eigenschaft der Entfaltung pleiotroper Effekte besitzen. Im Knochengewebe stimulieren Statine die BMP-2-Synthese in Osteoblasten. Die Nutzbarmachung dieser Wirkung für die Knochen- und Frakturheilung wäre überaus positiv, denn durch die Stimulierung der BMP-2-Produktion könnte auf die exogene Applikation von BMP-2 verzichtet werden. Daran anknüpfend war die Zielstellung dieser Dissertation, den Einfluss der lokalen Applikation eines Statins, Simvastatin, auf die Heilung der Tibiafraktur im Fraktumodell der Ratte zu untersuchen. Zur Dosisfindung wurde eine niedrige (3 µg) und eine hohe Dosierung Simvastatin high (50 µg) eingesetzt. Parallel erfolgte der Vergleich sowohl mit einer unbeeinflussten als auch mit einer durch den Wachstumsfaktor BMP-2 (50 µg) beeinflussten Heilung. Für die Methode der lokalen Applikation wurde das Trägermaterial PDLLA ausgewählt und die zu implantierenden Kirschnerdrähte mit PDLLA und Simvastatin oder mit BMP-2 beschichtet. Die Kirschnerdrähte dienten so neben der Frakturstabilisierung auch als Wirkstoffapplikatoren. Nach standardisierter Fraktur der Tibia erfolgte die Frakturversorgung entweder mit unbeschichteten, mit Simvastatin oder mit BMP-2 beschichteten intramedullären Kirschnerdrähten. Nach einem Untersuchungszeitraum von 28 Tagen erfolgte die Tötung der Tiere, danach die radiologischen, biomechanischen sowie histomorphologischen und histomorphometrischen Untersuchungen.

Die biomechanische Auswertung zeigte eine nahezu doppelt so hohe torsionale Steifigkeit und ein signifikant gesteigertes maximales Drehmoment der mit 50 µg Simvastatin high behandelten Tiere gegenüber den nicht behandelten Kontrolltieren. Die radiologische Auswertung mittels Röntgenscore ergab eine weiter fortgeschrittene Frakturkonsolidierung der Simvastatin high behandelten Tiere im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren. Histomorphometrisch waren ein reduzierter Knorpelanteil und eine signifikant verringerte Kortikalismineralisierung der Simvastatin high behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren festzustellen. Nahezu kein Einfluss auf die Heilung zeigte sich bei den Tieren mit der geringen Dosierung von 3 µg Simvastatin. Für die Positivkontrollgruppe BMP-2 wurden signifikant gesteigerte biomechanische Eigenschaften, eine radiologisch verstärkte Frakturkonsolidierung und ein histomorphometrisch signifikant verringerter Knorpelanteil im Frakturkallus ermittelt.

Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das Statin Simvastatin bei lokaler Applikation von PDLLA beschichteten Kirschnerdrähten einen dosisabhängig stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibiafraktur bei Ratten hat und dass die heilungsstimulierenden Wirkungen von Simvastatin im Vergleich zu dem intensiv erforschten Wachstumsfaktor BMP-2 später einsetzen.

Statine können die Synthese von BMP-2 stimulieren. Sie haben sich in jahrelanger klinischer Praxis als nebenwirkungsarm und gut verträglich erwiesen. Im Vergleich zu den kostenaufwändigen BMPs scheint der Einsatz von Statinen für die positive Beeinflussung der Knochenheilung sinnvoll. Im Ergebnis weiterführender Untersuchungen könnten sie die kostenträchtigen BMPs unter Umständen ablösen.

Die Technik der Beschichtung von Osteosynthesesysthemen mit dem Trägermaterial PDLLA erwies sich in dieser Dissertation als effektive Applikationsmethode für Simvastatin. Mit der Beschichtung von Osteosynthesesystemen sind vielfältige Vorteile verbunden, deshalb sollte sie auch bei einer möglichen Anwendung von Statinen beim Menschen zum Einsatz kommen.

6 Literaturverzeichnis

[1.] Einhorn T. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res 1998;355 (Suppl): S7-211.

[2.] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC et al. Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res 1999 Nov;14(11):1805-15.

[3.] Carano RA and Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug Discov Today 2003 Nov 1;8(21):980-9.

[4.] Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB et al. The expression of cytokine activity by fracture callus. J Bone Miner Res 1995 Aug;10(8):1272-81.

[5.] Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater 2008 Apr 1;15:53-76.

[6.] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin Cell Dev Biol 2008 Oct;19(5): 459-66.

[7.] Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop Relat Res 1989 Nov;(248):283-93.

[8.] Giannoudis PV and Atkins R. Management of long-bone non-unions. Injury 2007 May;38 Suppl 2:S1-2.

[9.] Bishop GB and Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. Int Orthop 2007 Dec;31(6):721-7.

[10.] Bell CS and Jackson RW. What's new in orthopaedic surgery? A review of major breakthroughs and advances in orthopaedics. BUMC Proceedings 1999;12:121-125.

[11.] Durst J and Rainer J. Traumatologische Praxis: In einem Band: Standards in Diagnostik und Therapie für alle Fachgebiete. Schattauer Verlag für Medizin und Naturwissenschaften 1997;37:561-578.

[12.] Coles CP and Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. Can J Surg 2000 Aug;43(4):256-62.

[13.] Stürmer KM. Pathophysiology of disrupted bone healing. Orthopäde 1996 Sep;25(5):386-93.

[14.] Runkel M and Rommens PM. Pseudoarthrosis. Unfallchirurg 2000 Jan;103 (1):51-63.

[15.] Geerts WH, Code KI, Jay RM et al. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. N Engl J Med 1994 Dec 15;331 (24):1601-6.

[16.] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG et al. Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin Orthop Relat Res 1996 Aug;(329):300-9.

[17.] Sanders DW, Galpin RD, Hosseini M et al. Morbidity resulting from the treatment of tibial nonunion with the Ilizarov frame. Can J Surg 2002 Jun; 45(3):196-200.

[18.] Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T et al. Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. Acta Orthop Scand 2003 Oct;74(5): 604-10.

[19.] Chen WJ, Jingushi S, Aoyama I et al. Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae. J Bone Miner Metab 2004;22(4):303-9.

[20.] Eckardt H, Ding M, Lind M et al. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental non-union model. J Bone Joint Surg Br 2005 Oct;87(10):1434-8.

[21.] Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F et al. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. Bone 2002 Jun;30(6):816-22.

[22.] Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. J Bone Joint Surg Am 2003 Aug;85-A(8):1425-35.

[23.] Mundy G, Garrett R, Harris S et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents. Science 1999 Dec 3;286(5446):1946-9.

[24.] Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. J Orthop Res 1995 May;13(3):357-67.

[25.] Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. Science 1965 Nov 12;150 (698):893-9.

[26.] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. Science 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.

[27.] Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC et al. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. J Bone Joint Surg Am 2005 Jun;87(6):1367-78.

[28.] Bramlage CP, Häupl T, Kaps C et al. Bone morphogenetic proteins in the skeletal system. Z Rheumatol 2005 Sep;64(6):416-22.

[29.] Dudley AT, Lyons KM and Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes Dev 1995 Nov 15;9(22):2795-807.

[30.] Zhang H and Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. Development 1996 Oct;122(10):2977-86.

[31.] Bellusci S, Henderson R, Winnier G et al. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. Development 1996 Jun; 122(6):1693-702.

[32.] De Santa Barbara P, Williams J, Goldstein AM et al. Bone morphogenetic protein signaling pathway plays multiple roles during gastrointestinal tract development. Dev Dyn 2005 Oct;234(2):312-22.

[33.] Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. Biochem Biophys Res Commun 1990 Oct 15;172(1):295-9.

[34.] Takuwa Y, Ohse C, Wang EA et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatise activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. Biochem Biophys Res Commun 1991 Jan 15;174(1):96-101.

[35.] Lind M, Eriksen EF and Bünger C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. Bone 1996 Jan;18(1):53-7.

[36.] Itoh T, Mochizuki M, Nishimura R et al. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. J Vet Med Sci 1998 Apr;60(4):451-8.

[37.] Govender S, Csimma C, Genant HK et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J Bone Joint Surg Am 2002 Dec;84-A(12):2123-34.

[38.] Schwabe U and Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2004. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2004;2:47-49.

[39.] Schwabe U and Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2008. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2008;2:66-68.

[40.] Drake MT, Clarke BL and Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. Mayo Clin Proc 2008 Sep;83(9):1032-45.

[41.] Rogers MJ, Gordon S, Benford HL et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2961-78.

[42.] Ito M, Amizuka N, Nakajima T et al. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. Bone 1999 Oct;25(4):447-52.

[43.] Selander KS, Mönkkönen J, Karhukorpi EK et al. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. Mol Pharmacol 1996 Nov;50(5):1127-38.

[44.] Van Beek E, Pieterman E, Cohen L et al. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. Biochem Biophys Res Commun 1999 Oct 14;264(1):108-11.

[45.] Dunford JE, Thompson K, Coxon FP et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. Pharmacol Exp Ther 2001 Feb;296(2):235-42.

[46.] Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH et al. Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: Evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. J Bone Miner Res 1998 Nov;13(11):1668-78.

[47.] Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: Inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. J Bone Miner Res 2000 Aug;15(8):1467-76.

[48.] Van Beek E, Löwik C, Van der Pluijm G et al. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. J Bone Miner Res 1999 May;14(5):722-9.

[49.] Skoglund B, Holmertz J and Aspenberg P. Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. J Orthop Res 2004 Sep;22(5):1108-13.

[50.] Greiner SH, Wildemann B, Back DA et al. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. Acta Orthop 2008 Oct;79(5):717-25.

[51.] Rogers MJ. Statins: Lower lipids and better bones? Nat Med 2000 Jan;6(1):21-3.

[52.] Schwabe U and Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2008. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2008;31:645-650.

[53.] Endo A, Kuroda M and Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by Penicillium citrinium. J Antibiot (Tokyo) 1976 Dec;29(12):1346-8.

[54.] Alberts AW, Chen J, Kuron G et al. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci USA 1980 Jul;77(7):3957-61.

[55.] Grundy SM. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. N Engl J Med 1988 Jul 7;319(1):24-33.

[56.] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 1999 Jan 14;340(2):115-26.

[57.] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 1994 Nov 19;344(8934):1383-9.

[58.] Shepherd J, Cobbe SM, Ford I et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med 1995 Nov 16;333(20): 1301-7.

[59.] Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. N Engl J Med 1998 Nov 5;339(19):1349-57.

[60.] MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. Lancet 2002 Jul 6;360(9326):7-22.

[61.] Blum CB. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Am J Cardiol 1994 May 26;73(14): 3D-11D.

[62.] Brown MS and Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986 Apr 4;232(4746):34-47.

[63.] Horiuchi N and Maeda T. Statins and bone metabolism. Oral Dis 2006 Mar;12(2):85-101.

[64.] Armitage J. The safety of statins in clinical practice. Lancet 2007 Nov 24; 370(9601):1781-90.

[65.] Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M et al. Simvastatin versus ezetimibe: Pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. Circulation 2005 May 10;111(18):2356-63.

[66.] Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK et al. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: Implications for plaque stabilization. Circulation 2001 Feb 20;103(7):926-33.

[67.] Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Circulation 1999 Jul 20;100(3):230-5.

[68.] Vollmer T, Key L, Durkalski V et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. Lancet 2004 May 15;363(9421):1607-8.

[69.] Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE et al. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. J Biol Chem 2007 Sep 14;282(37):26832-44.

[70.] McCarey DW, McInnes IB, Madhok R et al. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): Double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet 2004 Jun 19;363(9426):2015-21.

[71.] Laufs U. Therapie mit Statinen-Indikationen und Zielwerte/Erste Wahl bei der Lipidsenkung. Cardio Guide 2006 Apr;1. (Accessed July 10, 2009, at http://www.dgk.org.cme)

[72.] Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 2001 Sep 21;287(2):337-42.

[73.] Garrett IR, Gutierrez G and Mundy GR. Statins and bone formation. Curr Pharm Des 2001 May;7(8):715-36.

[74.] Maeda T, Matsunuma A, Kawane T et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun 2001 Jan 26;280(3):874-7.

[75.] Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem 2004 Jun 1;92(3):458-71.

[76.] Lupatelli G, Scarponi AM, Vaudo G et al. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. Metabolism 2004 Jun;53(6):744-8.

[77.] Chung YS, Lee MD, Lee SK et al. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. J Clin Endocrinol Metab 2000 Mar;85(3):1137-42.

[78.] Uzzan B, Cohen R, Nicolas P et al. Effectis of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies. Bone 2007 Jun;40(6):1581-7.

[79.] Wang PS, Solomon DH, Mogun H et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. JAMA 2000 Jun 28;283(24): 3211-6.

[80.] Scranton RE, Young M, Lawler E et al. Statin use and fracture risk: Study of a US veterans population. Arch Intern Med 2005 Sep 26;165(17):2007-12.

[81.] Schoofs MW, Sturkenboom MC, van der Klift M et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of vertebral fracture. J Bone Miner Res 2004 Sep;19 (9):1525-30.

[82.] Pasco JA, Kotowicz MA, Henry MJ et al. Statin use, bone mineral density, and fracture risk: Geelong Osteoporosis Study. Arch Intern Med 2002 Mar 11;162(5):537-40.

[83.] Reid IR, Tonkin A and Cannon CP. Comparison of the effects of pravastatin and atorvastatin on fracture incidence in the PROVE IT-TIMI 22 trial-secondary analysis of a randomized controlled trial. Bone 2005 Aug;37 (2):190-1.

[84.] LaCroix AZ, Cauley JA, Pettinger M et al. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: Results from the Women's Health Initiative Observational Study. Ann Intern Med 2003 Jul 15;139(2):97-104.

[85.] Wada Y, Nakamura Y, Koshiyama H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. Arch Intern Med 2000 Oct 9;160(18):2865.

[86.] Bone HG, Kiel DP, Lindsay RS et al. Effects of atorvastatin on bone in postmenopausal women with dyslipidemia: A double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. J Clin Endocrinol Metab 2007 Dec;92(12): 4671-7.

[87.] Gutierrez GE, Lalka D, Garrett IR et al. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. Osteoporos Int 2006;17(7):1033-42.

[88.] Ozeç I, Kiliç E, Gümüş C et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. J Craniofac Surg 2007 May;18(3):546-50.

[89.] Wong RW and Rabie AB. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. Br J Oral Maxillofac Surg 2003 Aug;41(4):244-8.

[90.] Serin-Kilicoglu S and Erdemli E. New addition to the statin's effect. J Trauma 2007 Jul;63(1):187-91.

[91.] Wang JW, Xu SW, Yang DS et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. Osteoporos Int 2007 Dec;18(12): 1641-50.

[92.] Skoglund B and Aspenberg P. Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. BMC Musculoskelet Disord 2007 Sep 27;8:98.

[93.] Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A et al. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. J Biomed Mater Res 2001;58(4):449-55.

[94.] Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B et al. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. Eur J Trauma 2004;30:35–42.

[95.] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 1987 Dec; 2(6):595-610.

[96.] Mueller M. AO Classification of Fractures Long Bones 2006. (Accessed June 18, 2008, at http://www.aofoundation.org)

[97.] Grasser WA, Baumann AP, Petras SF et al. Regulation of osteoclast differentiation by statins. J Musculoskelet Neuronal Interact 2003 Mar;3 (1):53-62.

[98.] Maritz FJ, Conradie MM, Hully PA et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 Oct;21(10):1636-41.

[99.] Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. J Bone Miner Res 2002 Nov;17(11):2004-8.

[100.] Von Knoch F, Wedemeyer C, Heckelei A et al. Promotion of bone formation by simvastatin in polyethylene particle-induced osteolysis. Biomaterials 2005 Oct;26(29):5783-9.

[101.] Nguyen ND, Wang CY, Eisman JA et al. On the association between statin and fracture: A Bayesian consideration. Bone 2007 Apr;40(4):813-20.

[102.] Toh S and Hernández-Díaz S. Statins and fracture risk. A systematic review. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2007 Jun;16(6):627-40.

[103.] Sugiyama M, Kodama T, Konishi K et al. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2000 May 19;271(3): 688-92.

[104.] Patil S, Holt G, Raby N et al. Prospective, double blind, randomized, controlled trial of simvastatin in human fracture healing. J Orthop Res 2009 Mar;27(3):281-5.

[105.] Gutierrez GE, Edwards JR, Garrett IR et al. Transdermal lovastatin enhances fracture repair in rats. J Bone Miner Res 2008 Nov;23(11):1722-30.

[106.] Thylin MR, McConnell JC, MJ et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. J Periodontol 2002 Oct;73(10):1141-8.

[107.] Nyan M, Sato D, Oda M et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. J Pharmacol Sci 2007 Aug;104(4):384-6.

[108.] Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B et al. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: A review. Injury 2006 May;37 Suppl 2:S105-12.

[109.] Einhorn TA. The science of fracture healing. J Orthop Trauma 2005 Nov-Dec;19(10 Suppl):S4-6.

[110.] Bonnarens F and Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res 1984;2(1):97-101.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stadien der sekundären Frakturheilung (modifiziert nach [3]) 9

Abb. 2: Mitglieder der TGF-β-Superfamilie [28] 13

Abb. 3: Verschiedene Interaktionen von Statinen und Bisphosphonaten im Mevalonatweg [51] 16

Abb. 4: Wirkungsmechanismus der Statine im Hepatozyten (modifiziert nach [63]) 18

Abb. 5: Möglicher Mechanismaus der gesteigerten BMP-2-Produktion unter Statinen über eine Inhibition von Zwischenprodukten des Mevalonatwegs (modifiziert nach [71]) 19

Abb. 6: Untersuchungsplan 28

Abb. 7: Aufbau der Frakturmaschine (modifiziert nach [94]) 29

Abb. 8: OP-Technik 32

Abb. 9: Exemplarische postoperative Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen 33

Abb. 10: Arbeitsplatz zur Anfertigung der Röntgenaufnahmen 34

Abb. 11: Präparation und Implantatentnahme 35

Abb. 12: Technik des Einbettens 36

Abb. 13: Versuchsaufbau zur biomechanischen Testung der Tibiae mit der Torsionsmaschine (modifiziert nach [94]) 37

Abb. 14: Exemplarischer Verlauf der Belastungs-Deformitätskurve einer Ratte 28 Tage postoperativ 38

Abb. 15: Mikrotom mit eingespanntem Schnittpräparat im Kunststoffblock 40

Abb. 16: Färbeergebnisse am Beispiel von histologischen sagittalen Schnittpräparaten einer Ratte 41

Abb. 17: Region of Interest (ROI) 43

Abb. 18: Körpergewicht und Körpertemperatur im Gruppenvergleich über den Studienzeitraum 46

Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Frakturtypen gemäß AO-Klassifikation (modifiziert nach [96]) 46

Abb. 20: Exemplarische laterale Röntgenaufnahmen im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 47

Abb. 21: Maximales Drehmoment [%] zur gesunden Seite im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 49

Abb. 22: Torsionale Steifigkeit [%] zur gesunden Seite im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 50

Abb. 23: Exemplarische sagittale histologische Schnittpräparate im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 52

Abb. 24: Gewebezusammensetzung im Frakturkallus 28 Tage postoperativ 53

Abb. 25: Exemplarische histologische Schnittpräparate einer Ratte der Gruppe II 28 Tage postoperativ 54

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gruppeneinteilung 27

Tab. 2: Röntgenscore [94] 34

Tab. 3: Färbeanleitung Versilberung nach von Kossa
Färbeanleitung Methylgrün/van Gieson 41

Tab. 4: Abkürzungsverzeichnis nach Parfitt [95] 42

Tab. 5: Ergebnisse des Röntgenscores im Gruppenvergleich
28 Tage postoperativ 48

Tab. 6: Histomorphom. Ergebnisse des Tibiadurchmessers
im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 55

Tab. 7: Histomorphom. Ergebnisse des periostalen Kallus
im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 56

Tab. 8: Histomorphom. Ergebnisse des Gesamtkallus
im Gruppenvergleich 28 Tage postoperativ 56

Tab. 9: Histomorphom. Ergebnisse der Kortikalis im Gruppenvergleich
28 Tage postoperativ 56

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese
Aqua dest	aqua destillatum
BESTT	BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma Study Group
BMP-1,2,4,7,16	Bone Morphogenetic Protein-1,2,4,7,16
cm	Zentimeter
d	dies
et al	et alii
EtOH	Ethylalkohol
Dtl	Deutschland
FGF	Fibroblast Growth Factor
FPP	Farnesylpyrophosphat
g	Gramm
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
histomorphom	histomorphometrisch
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K-Draht	Kirschnerdraht
kV	Kilovolt
l	Liter
LDL	Low Densitiy Lipoprotein
LIPID	Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-1,6	Interleukin-1,6
mAs	Milliampersekunde
MEA	3-Methoxy-Ethylacetat
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mm^2	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
N	Newton
N-BPs	Nitrogen-containing Bisphosphonates
Nmm	Newton-Millimeter
o g	oben genannt
OP-Technik	Operationstechnik
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDLLA	Poly[D,L-Laktid]
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
postop	postoperativ
rhBMP-2	Rekombinant Humanes Bone Morphogenetic Protein-2
ROI	Region of Interest
Simva high	Simvastatin high dose
Simva low	Simvastatin low dose
sog	Sogenannt
Tab	Tabelle
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
VEGF	Vascular-endothelial Growth Factor
vs	Versus
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study
4S	Scandinavian Simvastatin Survival Study
Vol.%	Volumen-Prozent
%	Prozent
Ø	Durchmesser
µg	Mikrogramm

10 Danksagungen

Zunächst möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda für die Möglichkeit danken, diese Dissertation am Julius Wolff Institut durchführen zu dürfen.

Insbesondere möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann und Herrn Oberarzt Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann. Sie hat meine Arbeit fortlaufend intensiv begleitet und stand für die Beantwortung aller Fragen und neu entstandener Probleme mit konstruktiven Hinweisen zur Seite. Sowohl in persönlichen Gesprächen als auch in multimedialen Konferenzen kam es zum gemeinsamen Gedankenaustausch, der mir eine Vielzahl wichtiger Anregungen lieferte. Ohne die Unterstützung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt habe ich von ihr vorbildhaft gelernt, dass Forschung auch immer Geduld und Durchhaltevermögen bedeutet.

Ferner möchte ich sehr herzlich Herrn Dr. med. Stephan Pauly danken, der diese Dissertation von klinischer Seite sehr kompetent betreut hat. Dabei erinnere ich mich gern an viele gemeinsame Stunden in der praktischen Arbeit im Labor des Julius Wolff Instituts. Herr Dr. med. Stephan Pauly hat mir durch seine angenehme, freundliche und überaus hilfsbereite Arbeitsweise Tag und Nacht eine persönliche Kontaktaufnahme im Zusammenhang mit dieser Dissertation ermöglicht, was zeitweise auch seine kostbare Freizeit beanspruchte.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Histologielabors des Julius Wolff Instituts danken. Besondere Unterstützung wurde mir durch Frau Gabriele Hardung und durch Herrn Dipl.-Biotech. (FH) Martin Wolny zuteil. Für die freundliche Unterstützung bei der Beantwortung von Fragen zur Bildanalyse möchte ich Herrn Martin Thiele danken.

Zudem möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Jan-Erik Hoffmann und Herrn cand. Dipl.-Ing. Alexander Schill, Biomechaniklabor Julius Wolff Institut, danken, die mir je-

derzeit bei der Beantwortung von biomechanischen Fragestellungen zur Seite standen.

Darüber hinaus möchte ich den Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung am Campus Virchow Klinikum danken.

Nicht zuletzt möchte ich meiner lieben Familie danken. Auch in Zeiten von Zweifeln und/oder nachlassender Motivation hat sie mich erfolgreich ermutigt. Meine Familie hat einen wesentlichen Anteil an dem erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation.

11 Lebenslauf

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

12 Publikationen

Pauly S, **Luttosch F**, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. Bone 2009 Sept;45 (3):505-11.

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

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

13 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Franziska Luttosch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss eines Statins auf die Heilung der Tibiafraktur - Eine Studie im Frakturmodell der Ratte - selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum Unterschrift