

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Seekamp
im Universitätsklinikum Schleswig – Holstein, Campus Kiel
an der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

**DIE WIRKUNG LOKAL APPLIZIERTER
BISPHOSPHONATE AUF DIE HEILUNG
GESCHLOSSENER FEMURSCHAFTFRAKTUREN DER
RATTE**

Eine tierexperimentelle Studie

INAUGURALDISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian – Albrechts – Universität zu Kiel

vorgelegt von
LEIF MENZDORF
aus Schleswig
Kiel 2016

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Sebastian Lippross, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Mark Ellrichmann, Klinik für Innere Medizin I mit dem Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

Tag der mündlichen Prüfung:

05.12.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den:

14.09.2017

gez.:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinischer Hintergrund	1
1.2	Bisphosphonate	3
1.3	Frakturheilung	6
1.3.1	Primäre Frakturheilung	8
1.3.2	Sekundäre Frakturheilung	8
1.3.3	Einfluss von Bisphosphonaten auf die Frakturheilung	10
1.4	Lokale Applikation von Medikamenten am Frakturspalt	12
1.5	Wissenschaftliche Fragestellung	13
2	Material und Methode	14
2.1	Studiendesign	14
2.2	Tierhaltung und Pflege	15
2.3	Lokale Applikation der Bisphosphonate	15
2.4	Operationsverlauf	16
2.4.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung	16
2.4.2	Einlage des Marknagels	16
2.4.3	Erzeugung der Femurfraktur	17
2.4.4	Einbringen der Kollagenmembran	18
2.4.5	Postoperatives Vorgehen	19
2.5	Versuchsabschluss und Präparation für Untersuchungen	20
2.6	Analysen	20
2.6.1	Mikro-Computertomographie (μ CT)	20
2.6.2	Histologie	23
3	Statistik	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Studienausschlüsse	28
4.2	Mikro-Computertomografie (μ CT)	28
4.3	Histologie	32
5	Diskussion	40
5.1	Diskussion des Versuchsaufbaus	40
5.1.1	Kleintiermodell	40
5.1.2	Frakturmodell	40

5.2	Diskussion der angewandten Methoden.....	41
5.2.1	Mikro-Computertomografie (μ CT).....	41
5.2.2	Histologie	41
5.3	Diskussion der Ergebnisse	42
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	44
6	Zusammenfassung	46
7	Abkürzungsverzeichnis.....	48
8	Literaturverzeichnis.....	49
9	Abbildungsverzeichnis.....	56
10	Danksagung	59
11	Versicherung	60
12	Tierversuchsgenehmigung	61
13	Curriculum vitae.....	62

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Die Osteoporose stellt ein immer größer werdendes Problem in der alternden westlichen Gesellschaft dar. Neben der medizinischen Relevanz gewinnt die Osteoporose zusätzlich zunehmend an sozialer und ökonomischer Bedeutung (Currey et al., 1996, Samelson and Hannan, 2006). Ursächlich spielen neben dem Alterungsprozess viele Faktoren eine Rolle. Zu den wichtigsten zählen der westliche Ernährungsstil, zudem Nikotin- und Alkoholkonsum, Hormonmangel der postmenopausalen Frau, kardiovaskuläre Erkrankungen und diabetische Stoffwechsellage (Zioupou and Currey, 1998). Die Pathogenese der Osteoporose umfasst die Störung des Kollagen- und Mineralsalzstoffwechsels, eine geringere Osteoblastenaktivität und einen gesteigerten Hydroxyprolinegehalt (McCalden et al., 1993). Die Homöostase im Knochenstoffwechsel unterliegt der exakten Regulation der nebeneinander ablaufenden osteogenen und osteoklastischen Prozesse. Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität bedingen einander und werden von vielen äußeren Faktoren beeinflusst. So werden die Osteoblasten durch das Parathormon, Calcitriol, Zytokine und durch freigesetzte Wachstumsfaktoren aus der von den Osteoklasten abgebauten Knochenmatrix stimuliert.

Klinisch führt die Osteoporose zu fragilen Knochen, die bei fortgeschrittener Erkrankung und bei inadäquatem Trauma oder sogar spontan frakturieren können (Wang et al., 2002).

Die steigende Inzidenz der Erkrankung bedingt die häufige klinische Präsentation osteoporotischer Frakturen in der unfallchirurgischen Praxis. Die derzeit gängige Therapie besteht aus operativer Frakturversorgung mit Standard-Osteosynthesematerialien und medikamentöser Behandlung mit Vitamin D, Kalzium und Bisphosphonaten (Epstein, 2006). Da die regenerationsfähige Kapazität des Knochens durch die osteoporotische Ausgangslage herabgesetzt ist, sind die Krankheitsverläufe durch langsame Heilung und häufige Re-Frakturierung gekennzeichnet. Eine typische Fraktur

des osteoporotischen Skeletts ist die hüftgelenksnahe Femurfraktur. Diese kann in einigen Fällen gelenkserhaltend mit einer Osteosynthese versorgt werden, z.B. der Dynamischen Hüftschraube (DHS). Diese bringt jedoch im osteoporotischen Knochen spezielle Komplikationen mit sich.

Durch ungenügende Abstützung im Kopfbereich des Femurs kommt es beispielsweise zum so genannten „cutting out“, dem Durchschneiden der Schraube durch Femurkopf und Schenkelhals. Es resultiert in vielen Fällen eine Destruktion der Gelenkfläche, so dass letztlich die Indikation zur Implantation einer Totalendoprothese gestellt werden muss. Ursächlich ist eine geringere Kallusbildung und damit Schwächung der Osteosynthese, deren Stabilität vom Material an sich und der zusätzlichen Abstützung durch den Frakturkallus abhängt. Eine Verbesserung der Frakturdurchbauung kann daher die Haltbarkeit der Osteosynthese verbessern. Der steigende fachmedizinische und pflegerische Aufwand, der durch die lange Rekonvaleszenzzeit entsteht, verdeutlicht die unbedingte Notwendigkeit neuer therapeutischer Konzepte. Das gilt sowohl aus medizinischer, als auch aus sozialökonomischer Sicht (Atik et al., 2006).

Seit langer Zeit werden im klinischen Alltag Bisphosphonate zur Therapie der Osteoporose eingesetzt. Sie wirken über eine Hemmung der Osteoklasten und verhindern so die Auflösung von Kalziumphosphatkristallen. Damit wirken sie der Knochenresorption und dem fortschreitenden Substanzverlust durch die Erkrankung entgegen. Die gewebespezifische Wirkung von Bisphosphonaten ergibt sich aus deren hohen Affinität zu Oberflächen von festen Kalziumphosphaten, mit der sie stabile Bindungen eingehen (Fleisch, 2002, Fleisch, 2003). Von der Knochenoberfläche werden die Bisphosphonate insbesondere in die Osteoklasten aufgenommen und entfalten in diesen Zellen ihre Wirkung.

Die Stabilität einer Osteosynthese hängt von der regenerativen Kapazität des Gewebes ab. Re-Frakturen können durch ein gestörtes Verhältnis von Knochenabbau und Knochenaufbau begünstigt werden. Durch das Einbringen von Fremdkörpern oder durch Abriebpartikel bei Prothesen kann es zusätzlich zu einer Fremdkörperreaktion kommen, die ein Auslockern des Implantats begünstigt (Schmalzried et al., 1992). In jedem Fall wird Knochen durch

Osteoklasten resorbiert, die eine ausreichende Verankerung verhindern können.

1.2 Bisphosphonate

Bisphosphonate werden seit langem in der Therapie der Osteoporose verwendet (Saville and Heaney, 1972, Fleisch, 1993).

Sie wurden aus den Pyrophosphaten entwickelt, die in der Industrie und in der Medizin angewendet werden. Medizinisch werden sie auf Grund ihrer starken Affinität zu Kalziumphosphat in der Behandlung von ektopen Kalzifikationen und als Tracer in Verbindung mit ^{99m}Tc in der Skelettszintigrafie eingesetzt. Die Pyrophosphate haben jedoch keinen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, da sie schnell enzymatisch gespalten werden und somit ihre Wirkung verlieren.

Bisphosphonate sind die chemische Weiterentwicklung der Pyrophosphate und werden auf Grund des Austausches eines Sauerstoffatoms gegen ein Kohlenstoffatom nicht enzymatisch gespalten.

Sie wirken insbesondere auf Osteoklasten, da diese die Substanz durch Phagozytose aufnehmen und anreichern. Bisphosphonate binden ebenfalls an das Kalziumphosphat des Knochens und werden in den Resorptionslakunen durch die knochenabbauenden Zellen aufgenommen, so können sie ihre Wirkung in den Zellen entfalten.

Es werden drei chemische Gruppen von Bisphosphonaten unterschieden.

Bisphosphonate ohne Stickstoffsubstitution, wie Etidronat. Diese werden in Phosphatketten von ATP-haltigen Zellstrukturen der Osteoklasten integriert und induzieren dadurch den programmierten Zelltod, die Apoptose.

Aminobisphosphonate, wie das in dieser Studie verwendete Pamidronat, inhibieren die Farnesyl-Phosphat-Synthase. Die Hemmung dieses Enzyms der Cholesterinsynthese hat zur Folge, dass Zellfunktionen wie die Zytoskelettformation und intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen der Osteoklasten gestört werden. Das Fehlen von prenylierten Proteinen im Osteoklasten führt zur Auflösung der „ruffled border“ und somit zu einer grundlegenden strukturellen Veränderung der Zellen. Durch die unterbrochenen Signalwege und strukturellen Veränderungen gehen die betroffenen Zellen in den programmierten Zelltod (Reno et al., 2013).

Am Stickstoff substituierte Bisphosphonate (Olpadronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat) wirken ebenfalls auf die Enzyme des Cholesterinstoffwechsels. Die Farnesyl- und Geranylanylketten sind essentiell für die Funktion membranständiger GTPasen. Ohne die Seitenketten können sich diese Proteine nicht in der Zellmembran verankern und verlieren somit ihre Funktion (Bartl et al., 2006).

Die Substanzen greifen auch in den Signalweg zwischen den Osteoklasten und Osteoblasten ein. Physiologisch herrscht ein fragiles Gleichgewicht zwischen den aktiven Osteoblasten und Osteoklasten. Diese Zellen können sich gegenseitig stimulieren, dies ist eine Schlüsselfunktion im Knochenstoffwechsel. Über den „Receptor Activator of the NF- κ B - Ligand“ (RANKL) und den „Receptor Activator of the NF- κ B“ (RANK) findet diese Stimulierung im Wesentlichen statt. RANKL wird unter anderem von den Osteoblasten synthetisiert. Die Aktivierung des RANK auf monozytären Vorläuferzellen stimuliert diese Zellen, sich zu aktiven Osteoklasten zu differenzieren.

Osteoblasten sezernieren jedoch auch das Osteoprotegerin (OPG), welches den RANKL binden kann und somit indirekt die Aktivierung der Vorläuferzellen hemmt. Die Störung dieses Signalweges ist auch der Grundmechanismus für die postmenopausale Osteoporose. Östrogen ist ebenfalls ein Hemmer des RANKL. Fällt der Östrogenspiegel postmenopausal ab, entfällt diese Hemmung. Somit werden mehr Vorläuferzellen stimuliert und

differenzieren sich zu aktiven Osteoklasten (Milas-Ahic et al., 2014, Findlay and Atkins, 2011).

Bisphosphonate hemmen die Synthese der mRNA für RANKL. Zudem wird die Synthese von OPG gesteigert (Tsubaki et al., 2012). So ist es möglich, den fortschreitenden Knochenabbau langfristig zu minimieren.

Bisphosphonate können oral oder intravenös appliziert werden. Oral appliziert haben sie eine sehr geringe Bioverfügbarkeit (< 1%). Intravenös appliziert erreichen sie jedoch eine Bioverfügbarkeit von ca. 70%. Die bekannten Nebenwirkungen der Bisphosphonate sind von der Applikationsform abhängig. Die parenterale Applikation sollte in mehreren Einzeldosen oder als langsame Infusion erfolgen, um hohe Wirkstoffspiegel im Blut zu vermeiden. Hohe Plasmaspiegel haben zur Folge, dass die Bisphosphonate vermehrt renal eliminiert werden. Hierbei kommt es zu einer erhöhten Konzentration des Wirkstoffes in den Tubuluszellen der Niere. Sie entfalten intrazellulär die gleiche Wirkung wie die für die Osteoklasten oben beschriebene. In diesem Fall wirken die Bisphosphonate nephrotoxisch.

Nicht nur die Bioverfügbarkeit ist abhängig von der Darreichungsform, auch die unerwünschten Arzneimittelwirkungen (Nebenwirkungen) hängen ab vom Applikationsweg.

Bei oraler Applikation sind vor allem gastroenterale Nebenwirkungen bekannt. Nach einer intravenösen Applikation kommt es häufig zu grippeähnlichen Symptomen mit Fieber, Schüttelfrost und Abgeschlagenheit.

Eine weitere Nebenwirkung ist die Hypokalzämie und Hypomagnesiämie. Bisphosphonate bilden im Serum mit dem Kalzium Komplexe. So verringert sich das ionisierte Kalzium im Serum. Dieses Phänomen wird häufig bei zu schneller Infusion des Wirkstoffs beobachtet. Die Bisphosphonate können auch Bindungen mit den Magnesium-Kationen eingehen, so dass es begleitend zu einer Hypomagnesiämie kommen kann.

Das größte Problem mit dem systemischen Einsatz der Bisphosphonate ist die osteolytische Aktivität im Kieferknochen (Schwartz, 2005).

1.3 Frakturheilung

Wirkt eine Kraft auf einen Knochen ein, der dieser nicht standhalten kann, so kommt es zur Kontinuitätsunterbrechung des Knochens. Dies geht mit Funktionsverlust und Schmerzen einher. Mögliche Ursachen sind eine singuläre Gewalteinwirkung, aber auch Stressfrakturen beim osteoporotischen Knochen oder bei langanhaltender Krafteinwirkung.

Als Folge einer Fraktur setzen kurz darauf spezifische Prozesse ein, um den Defekt zu heilen. Die Frakturheilung ist ein komplexer Vorgang, in dem verschiedene Zellen und Gewebetypen eine wichtige Rolle spielen.

Man differenziert die Heilungsprozesse des Knochenbruchs in primäre und sekundäre Frakturheilung (Einhorn, 1998, McKibbin, 1978).

Ist die Kontinuität des Periosts erhalten, setzt die primäre Frakturheilung ein. Hierbei ist der Frakturspalt meist kleiner als 1 mm. Dies kann ebenfalls durch Osteosynthesen erreicht werden, durch die eine Reposition und Kompression der Bruchenden aufeinander erreicht wird. Bei der primären Knochenbruchheilung entsteht kein Kallus. Die Osteoklasten räumen an den Bruchenden das geschädigte Knochengewebe ab.

Aus dem Endost wandern Osteoprogenitorzellen in das Frakturgebiet ein. Mit ihnen wachsen Kapillaren in die Frakturzone ein, es bilden sich Osteone. Der Frakturspalt wird mit von den Osteoblasten neu gebildeter Knochenmatrix aufgefüllt. Nachfolgend erfolgt das Haverssche Remodeling in longitudinaler Richtung (Rodan, 1998). Man spricht hier von der Kontaktheilung.

Ist der Frakturspalt größer als 1 mm oder herrscht keine Kompression der Frakturenden aufeinander, setzt die sekundäre Frakturheilung ein. Dieser Heilungsprozess findet häufiger statt als die primäre Frakturheilung.

Die sekundäre Knochenbruchheilung lässt sich in mehrere Phasen einteilen. Diese Phasen greifen ineinander und finden teilweise zeitgleich statt.

Am Anfang steht die inflammatorische Phase, in der durch die Knochen- und Weichteilschädigung Entzündungsbotenstoffe freigesetzt werden. Zudem bildet sich ein Frakturhämatom durch Blutung aus dem Knochenmark und aus zerrissenen Blutgefäßen. Die lokale Entzündungsreaktion geht mit einer Schwellung einher.

In der zweiten Phase wachsen neue Blutgefäße ein (Angiogenese), es wird eine Bindegewebe- und Knorpelmatrix in der Frakturregion gebildet.

Nachfolgend erfolgt die Verknöcherung dieser Matrix. Pluripotente Mesenchymzellen differenzieren sich zu Osteoblasten und produzieren Osteoid. Dieses verknöchert zunehmend durch Mineralisation. So entsteht der aus Geflechtknochen gebildete knöcherne Kallus.

Abschließend erfolgt das Remodeling des Knochens. (Cruess and Dumont, 1975, Bolander, 1992).

Dem kortikalen Knochen, dem Periost, dem die Fraktur umgebenden Weichteilgewebe, sowie dem Knochenmark kommen bei der Frakturheilung jeweils besondere Bedeutungen zu (Einhorn, 2005). Die wesentlich beteiligten Zellen sind Osteoklasten, Osteoblasten, Fibroblasten und Chondrozyten.

Die Osteoblasten gehen aus fibroblastenähnlichen Osteoprogenitorzellen hervor, die unter dem Periost persistieren. Die aktivierten Osteoblasten bauen die Knochenmatrix auf, sie sezernieren kollagene Fibrillen und Osteoid. Die Osteoblasten werden regelmäßig in die Knochenmatrix eingemauert und bleiben hier, durch Canaliculi verbunden, als Osteozyten liegen (Eriksen, 2010).

Osteoklasten räumen Knochengewebe ab. Diese mehrkernigen Riesenzellen bilden Resorptionslakunen, in der sie durch Sekretion von H^+ -Ionen ein saures Milieu schaffen. Diese Resorptionslakunen werden auch als Howship'sche Lakunen bezeichnet. Darüber hinaus haben die Osteoklasten die wichtige Funktion, die Bohrkanäle des sog. Haversschen Umbaus zu schaffen.

Osteoblasten stimulieren die Osteoklastenvorläuferzellen zur Fusion durch M-CSF (macrophage colony-stimulation factor). Ebenso wirkt hier die Interaktion des auf dem Osteoblasten membranständigen receptor activator of NF-κB Ligand (RANKL) mit dem receptor activator of NF-κB (RANK). Dieser Aktiveringungsweg kann durch Östrogene oder durch das ebenfalls vom Osteoblasten sezernierte Osteoprotegerin (OPG) gehemmt werden. Über diesen Aktiveringungsweg stimuliert der Osteoblast ebenfalls die inaktiven Osteoklasten, so dass diese eine Resorptionslakune bilden. Die aktivierten Osteoklasten werden durch Calcitonin und Östrogene zur Apoptose angeregt.

1.3.1 Primäre Frakturheilung

Ist eine Fraktur optimal adaptiert, stabil fixiert und ausreichend an die Blutversorgung angeschlossen, kann die primäre Frakturheilung erfolgen. Es bildet sich nur eine geringe Kalluswolke um die Bruchstelle herum. Die Heilungsprozesse finden im Wesentlichen im Frakturspalt statt.

Die primäre Frakturheilung kann weiterhin unterschieden werden in Kontaktheilung und in Spaltheilung.

Von Kontaktheilung spricht man, wenn die Fraktarenden direkten Kontakt haben und kein wirklicher Spalt zwischen den Enden liegt. So können direkt Osteone einwachsen und die Fraktur stabilisieren (Schenk and Willenegger, 1964).

Für eine Spaltheilung ist es notwendig, dass die Fraktarenden nicht weiter als 1 mm voneinander entfernt liegen. Diese Form der Frakturheilung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird der Frakturspalt mit lamellären Knochen aufgefüllt. Der Lamellenknochen wächst quer zur Längsachse des Knochens. Im zweiten Schritt wird der lamelläre Knochen dann im Sinne des Havers-Systems umgebaut (Rahn et al., 1971, Willenegger et al., 1971).

1.3.2 Sekundäre Frakturheilung

Sekundäre Frakturheilung findet statt, wenn die Fraktarenden nicht stabil fixiert sind. Diese Form der Frakturheilung ist wesentlich häufiger und geht mit einer vermehrten Kallusbildung einher.

Die sekundäre Frakturheilung verläuft in drei Phasen. Diese Phasen verlaufen nicht streng nacheinander, sondern gehen zum Teil zeitgleich vonstatten (Frost, 1989b, Frost, 1989a, Cruess and Dumont, 1975).

Jede dieser Phasen wird durch die Anwesenheit bestimmter Zellgruppen repräsentiert. Es werden die *inflammatorische Phase*, die *reparative Phase* sowie die *Remodeling-Phase* unterschieden

Die inflammatorische Phase folgt direkt auf das Trauma. Die den Knochen umgebenden Strukturen werden durch das Trauma gequetscht. Hierdurch werden Entzündungsfaktoren freigesetzt. Nachfolgend kommt es zur Einwanderung von Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen. Die Inflammation bedingt eine ödematöse Schwellung des Weichteilgewebes, welche die Frakturzone umgibt. Die inflammatorische Phase prägt die erste posttraumatische Woche und erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 48 Stunden.

Durch die Schädigung von Blutgefäßen bildet sich das Frakturhämatom. Die dabei ablaufende Komplement-Kaskade bedingt die Thrombozytendegeneration mit Ausschüttung der α -Granula. Die α -Granula bestehen aus Matrixproteinen wie Fibrinogen und Fibronectin, sowie aus Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und TGF- β (Transforming growth factor beta). Des Weiteren sind diverse Blutgerinnungsfaktoren enthalten (Blair and Flaumenhaft, 2009). Die Granula wirken chemotaktisch auf die einwandernden Leukozyten. Ebenso werden Wachstumsfaktoren freigesetzt, insbesondere Vascular endothelial growth factor (VEGF), der vor allem die Vasculogenese induziert (Glowacki, 1998). Das saure Milieu und die herrschende Hypoxie bieten optimale Bedingungen für die Aktivität der Granulozyten und der Makrophagen.

Die reparative Phase beginnt in den ersten Tagen nach erfolgtem Trauma, noch bevor die inflammatorische Phase abgeschlossen ist. Diese Phase dauert einige Wochen an. Das Endprodukt ist der mechanisch stabile Kallus,

der sowohl intrafragmentär liegt, als auch den Bruchspalt von außen umschließt.

In dieser Phase werden die Fraktarenden nekrotisch, die Osteozyten und das dem Frakturspalt nahe Periost gehen zugrunde. Das saure Milieu ändert sich und wird leicht alkalisch. Dies bietet optimale Bedingungen für die Arbeit der alkalischen Phosphatase. Nun wandern pluripotente mesenchymale Stammzellen ein und differenzieren sich zu Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten. Diese Zellen bilden die Grundlage für den entstehenden Kallus. An den Fraktarenden kommt es im spongiösen Knochen, gegensätzlich zum kortikalen Knochen, zu einer direkten Osteogenese ohne die Knorpelbildung als Zwischenschritt. Dieser Prozess wird als intramembranöse oder auch desmale Ossifikation bezeichnet. Dies geht auf die direkte Differenzierung der Vorläuferzellen zu Osteoblasten zurück. Das neu generierte Gewebe wird als *harter Kallus* bezeichnet.

Um die intramembranöse Ossifikation herum findet Chondrogenese statt. Die Vorläuferzellen aus dem Periost synthetisieren eine avaskuläre Matrix. Zusammen mit dem Knorpel wird dies als *weicher Kallus* bezeichnet (Bolander, 1992). Mitte der zweiten Woche überzieht die Knorpelmatrix die Fraktarenden, und eine enchondrale Ossifikation beginnt. In diesem Prozess beginnt die Verknöcherung der Knorpelschollen, und der weiche Kallus wird in harten Kallus umgewandelt.

Die Remodeling-Phase ist die letzte Phase der Frakturheilung. Es wird der Geflechtknochen durch lamellären Knochen ersetzt. Die Kalluswolke wird resorbiert und die äußere Kontur der Kortikalis wiederhergestellt.

1.3.3 Einfluss von Bisphosphonaten auf die Frakturheilung

Bisphosphonate haben eine feste Rolle in der Behandlung der Osteoporose und in der Behandlung des Morbus Paget, der Osteogenesis imperfecta und bei osteolytischen Knochenmetastasen (Fleisch, 2002).

Bisher wurde die Wirkung von Bisphosphonaten auf die Frakturheilung in verschiedenen Studien dargelegt. Li et al. untersuchten im Jahr 2000 die

Wirkung von systemisch applizierten Bisphosphonat auf die Frühphase der Frakturheilung in der Ratte. Hierfür wurden den Versuchstieren zwei Wochen vor dem Trauma Incadronate oder ein Placebo gespritzt. Nach Applikation der Femurfraktur wurden die Tiere in weitere Gruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt nach dem Trauma keine weiteren Anwendungen. Die andere Gruppe erhielt weiterhin Bisphosphonate. Die Untersucher konnten zeigen, dass systemisch applizierte Bisphosphonate in der Ratte einen Effekt auf die Frakturheilung haben. Es wurden eine verlangsamte Frakturheilung der Femurschaftfraktur sowie eine Erhöhung des Kallusvolumens beobachtet (Li et al., 2000). In der biomechanischen Testung konnten keine Unterschiede in der Stabilität der mit Bisphosphonat behandelten Frakturen im Vergleich zu nicht mit Bisphosphonaten behandelten Frakturen nachgewiesen werden.

Die systemisch applizierten Bisphosphonate hatten hier einen hemmenden Effekt auf die Osteoklasten. Die Knochenresorption war verringert und die Osteoblastenaktivität im Verhältnis erhöht, so dass ein größeres Kallusvolumen entstand. Jedoch war das Remodeling des Kallus im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert. Die Autoren werten dies als einen positiven Effekt auf die frühe Phase der Frakturheilung mit jedoch insgesamt verlängerter Heilung. Diese Verlängerung wird mit der hohen Konzentration des Pharmakons im Frakturspalt und die damit langfristige Hemmung der Osteoklasten begründet. Die Osteoklasten haben eine Schlüsselrolle im Remodeling des Knochens, da sie die sog. Bohrkanäle (Havers-Kanäle) schaffen (Feng and McDonald, 2011). Durch die generelle und langfristige Hemmung der Osteoklastenaktivität kann dieser Schritt des Knochenumbaus nicht stattfinden.

Dayer et al. untersuchten, welchen Effekt systemisch applizierte Bisphosphonate auf die Verankerung von metallischen Implantaten im Knochen bei proteinrestriktiver Diät haben (Dayer et al., 2007). Unter dieser Bedingung zeigt sich eine schlechtere ossäre Verankerung von Titanimplantaten. Zu einer katabolen Stoffwechsellage kommt es häufig bei älteren Patienten.

Die Autoren untersuchten im Rattenmodell, ob die Applikation von Parathormon oder Pamidronat einen positiven Effekt auf die Festigkeit eines

Titanimplantates in der Tibia der Versuchstiere hatte. Neben der biomechanischen Untersuchung erfolgte auch die Beurteilung der Knochenmikrostruktur mittels Mikro-CT. Es zeigte sich, dass Bisphosphonate hier einen positiven Effekt auf die Festigkeit des Implantats bei Tieren mit kataboler Stoffwechsellage haben. Die Trabekeldicke des umgebenden Knochens hat nicht, wie in der Kontrollgruppe, abgenommen. Es wurde somit der positiver Effekt der Bisphosphonate als Hemmer der Knochenresorption durch die Hemmung der Osteoklasten gezeigt.

In weiteren Studien wurde die lokale Applikation von Bisphosphonaten durch die Beschichtung von Implantaten untersucht (Kajiwara et al., 2005, Wermelin et al., 2008). Die Autoren beschreiben einen positiven Effekt auf die Fixierung der Implantate im Knochen. In computertomographischen und histologischen Untersuchungen konnte eine dichtere Knochenmatrix unterhalb der beschichteten Implantatareale nachgewiesen werden. Wermelin et al. folgern aus ihren Beobachtungen, dass in der frühen Phase der Einheilung des Implantats eine Matrix aus undifferenzierten Knochen um das Implantat herum entsteht. Diese Matrix wird nicht, wie in der Kontrollgruppe, durch die Osteoklasten abgeräumt, da diese durch das Bisphosphonat gehemmt werden. Sie dient vielmehr als eine Art Grundgerüst, an dem nachfolgend neuer Knochen entsteht. Durch das neu entstandene Knochengewebe im Markraum ist die höhere Festigkeit des Implantats begründet.

1.4 Lokale Applikation von Medikamenten am Frakturspalt

Das lokale Einbringen von Medikamenten in den Frakturspalt ist eine übliche Methode. Diese kommt insbesondere bei der Behandlung von Infektionen und verzögerter Heilung im Sinne einer Pseudarthrose zum Tragen. Aber auch bei der Implantation von Gelenksprothesen wird versucht, eine bessere Verbindung von Implantat und Knochen medikamentös zu induzieren (Basarir et al., 2009).

In der Behandlung von Pseudarthrosen kommen vor allem BMP-2 und PRP zum Einsatz (Govender et al., 2002, Memeo et al., 2014).

Es wurde auch versucht, Simvastatin, welches die Synthese von BMP-2 induziert, lokal in den Frakturspalt einzubringen (Patil et al., 2009).

Bei Infektionen von Implantaten ist es ein übliches Verfahren, das Implantat zu explantieren und einen mit Antibiotika versetzten Platzhalter aus Knochenzement einzusetzen. Dieser verbleibt, bis der Infekt saniert ist und ein erneuter Gelenkersatz stattfinden kann (Kelm et al., 2009, Fink, 2009).

Lokal applizierte Antibiotika werden auch in der Behandlung von offenen Knochenbrüchen (Ostermann et al., 1993, Penn-Barwell et al., 2014) und in der Behandlung der Osteomyelitis eingesetzt (Kanakaris et al., 2014).

1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

Da Bisphosphonate die osteoklastäre Aktivität hemmen, liegt die Vermutung nahe, dass eine solche Wirkung die osteoblastäre Aktivität begünstigt und so zu einer verbesserten Frakturheilung führen könnte.

Das Ziel der Studie ist daher zu untersuchen, ob die lokale Applikation von Bisphosphonaten am Frakturspalt zu einer stärkeren Kallusbildung und damit zu einer biomechanisch verbesserten Frakturheilung führen kann. Mittels einer Bisphosphonat-getränkten, resorbierbaren Kollagenmembran können Bisphosphonate lokal appliziert werden. Damit kann die applizierte Dosis am Wirkungsort genau kontrolliert werden. Die lokal applizierte Dosis kann gering gehalten werden, so dass die zu erwartenden Nebenwirkungen minimiert werden. Der Vorteil der lokalen Applikation ist, dass eine geringere Menge an Wirkstoff benötigt und so das Risiko von Osteonekrosen reduziert wird.

Die Fragestellung ist, ob diese Effekte auch positiv auf das Verhalten der Zellen bei der Frakturheilung in einem nicht an Osteoporose erkrankten Organismus genutzt werden können. Die vermehrte Kallusbildung sollte eine

frühere Heilung anzeigen. Zudem soll geklärt werden, ob die o.g. positiven Effekte auch bei geringen Dosen durch lokale Applikation zu beobachten sind.

2 Material und Methode

Als Versuchstiere kamen 200 Gramm (\pm 12 Gramm) schwere weibliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories Germany GmbH, Sulzfeld) zum Einsatz.

Alle Operationen wurden in der zentralen Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Alle Versuche wurden durch die Ethikkommission des Landes Schleswig-Holstein, Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume genehmigt (V 312-72241.121-9 (23-3/08)).

2.1 Studiendesign

Alle in die Studie eingeschlossenen Tiere ($n = 44$) wurden in vier Gruppen eingeteilt. Zu zwei Zeitpunkten wurde die Frakturheilung untersucht. Verglichen wurde die Bisphosphonatbehandlung gegen eine Kontrollgruppe. Dagegen standen die Nager ohne Bisphosphonatbehandlung als Kontrollgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.

<u>Bisphosphonat</u>	<u>Bisphosphonat</u>
14 Tage n = 12	28 Tage n = 14
<u>Kontrolle</u>	<u>Kontrolle</u>
14 Tage n = 9	28 Tage n = 9

Abbildung 1: Einteilung der Versuchstiere in die Studiengruppen.

2.2 Tierhaltung und Pflege

Vor Versuchsdurchführung wurden die Tiere eine Woche lang im Kleintierstall der zentralen Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an die lokalen Bedingungen akklimatisiert.

Im Tierstall herrschten konstante Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit. Es wurde ein 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus von je 12 Stunden (6 – 18 Uhr) aufrecht erhalten. Die Tiere wurden in Gruppen von 4 bis 5 Tieren gehalten. Nach erfolgter Operation wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Die Tiere hatten in allen Käfigen freien und permanenten Zugang zu Trinkwasser und Futter. Dem Trinkwasser wurde nach der Operation für drei bis fünf Tage gewichtsadaptiert (100 mg/kg Körpergewicht) Metamizol zur Analgesie hinzugefügt.

Täglich erfolgte eine Kontrolle der Tiere bezüglich Gesundheit, Schmerzfreiheit und Vigilanz anhand der qualitativen Beurteilung des Gangbildes und des Ess- und Trinkverhaltens.

2.3 Lokale Applikation der Bisphosphonate

Für diesen Versuch wurde das Aminobisphosphonat Pamidronat (Pamifos[®] - Medac GmbH, Wedel) verwendet.

Die Dosis wurde mit 0,6 mg pro Kilogramm Körpergewicht gewählt, dies entspricht für eine 200 Gramm schwere Ratte 12 µg Pamidronat (Dayer et al., 2007). Als Substanzträger wurden 0,5 x 1,0 cm große Kollagenmembranen (Geistlich Bio-Glide[®], Geistlich Pharma AG, Wolhusen Switzerland) verwendet. Vor Beginn der Operation wurden diese Membranen in isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9% Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) oder 12 µg Pamidronat in 0,5 ml NaCl getränkt.

2.4 Operationsverlauf

Vor dem Eingriff wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip der jeweiligen Studiengruppe zugeteilt.

Die Tiere wurden einzeln aus den Käfigen entnommen und zunächst an den Untersucher gewöhnt. Dann erfolgte die peritoneale Injektion der Narkose.

2.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Es wurde eine intraperitoneale Allgemeinanästhesie appliziert. Die Dosierung der Narkose erfolgte gewichtsadaptiert (Fentanyl 0,005 mg/kg, Midazolam 2,0 mg/kg und Medetomidin 0,15mg/kg). Das Tier wurde an der Nackenfalte gehalten, und es erfolgte die vorsichtige Injektion von 0,5 ml mit einer sterilen Einmalkanüle (Sterican[®] B. Braun Melsungen AG).

Nach Überprüfen der Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes wurde der rechte Hinterlauf des Tieres rasiert und mit Hautdesinfektionsspray (Kodan[®] Tinktur forte farblos, Schülke und Mayr AG, Norderstedt) dreimalig desinfiziert.

2.4.2 Einlage des Marknagels

Es wurde ein operativer Zugang am rechten Kniegelenk des Hinterlaufes durch eine Inzision medial der Patellarsehne geschaffen. Die Sehne wurde nach lateral luxiert, so dass nun freie Sicht auf die Femurkondylen bestand. Durch die Fossa intercondylaris wurde eine Spritzenkanüle, die als Marknagel funktioniert, retrograd in den Knochen eingebracht (Abb. 2). Der Nagel wurde im Knochenniveau versenkt, so dass die Funktion des Kniegelenkes nicht beeinträchtigt war. Anschließend wurde die Wunde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Ethilon II 4-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verschlossen.

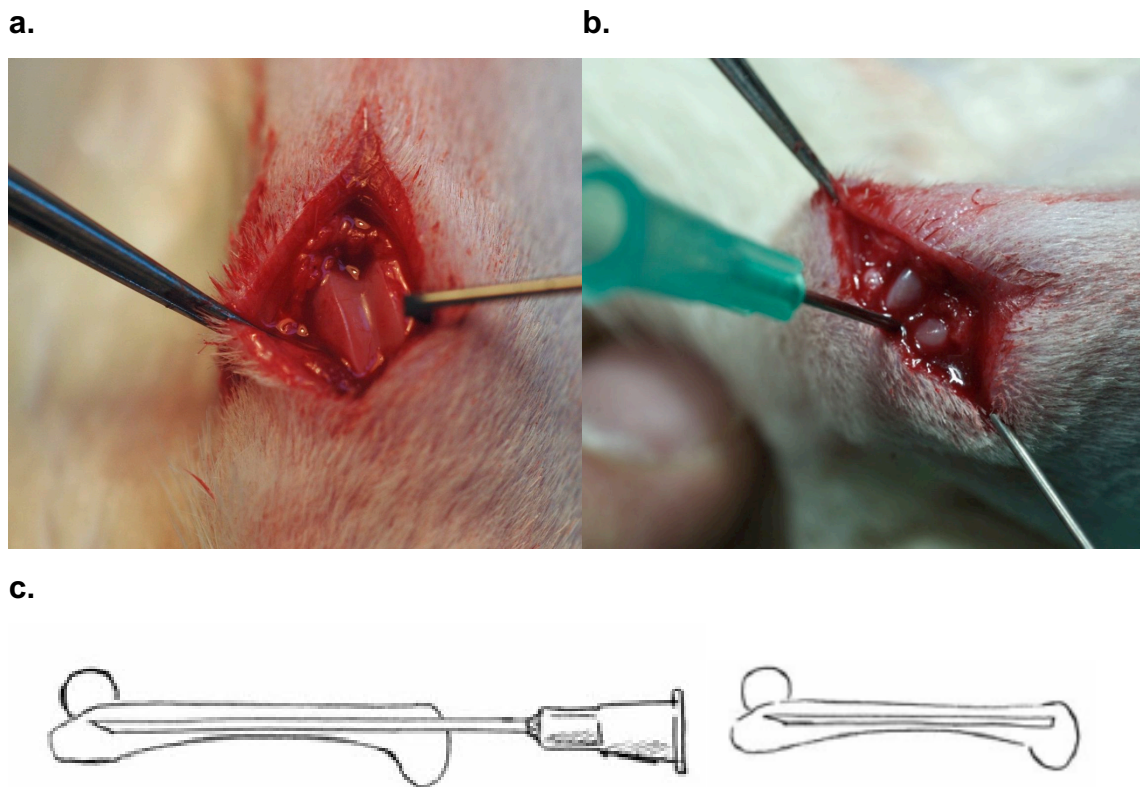
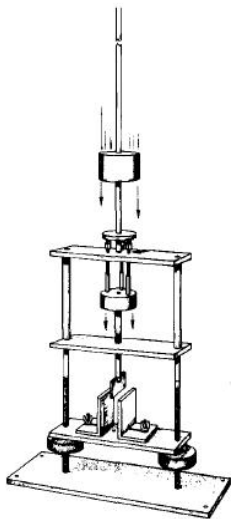


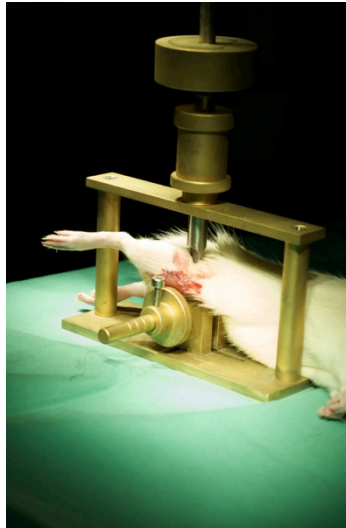
Abbildung 2: a. Darstellung der Fossa intercondylaris b. Einbringen des Femurnagels c. Schematische Darstellung des Marknagels

2.4.3 Erzeugung der Femurfraktur

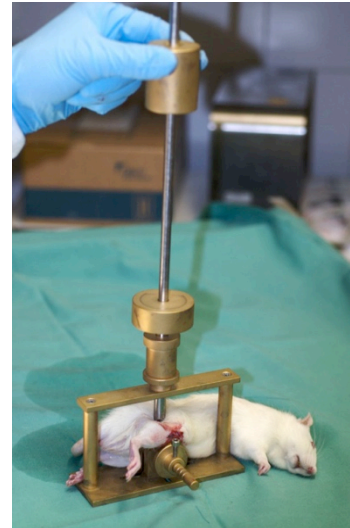
Die Femurfraktur wurde mit einem Frakturapparat (Bonnarens and Einhorn, 1984) (Abb. 3) erzeugt, der nach dem Prinzip einer Drei-Punkt-Biegeapparatur funktioniert. Mit dieser Vorrichtung wird die Krafteinwirkung dosiert und standardisiert. Zunächst wird das Versuchstier in der Vorrichtung gelagert. Dann erfolgte die Platzierung des Kraftüberträgers auf das Femur. Nun wird ein Gewicht von 500 Gramm aus einer Höhe von 20 cm fallen gelassen. Durch einen Begrenzungsmechanismus ist sichergestellt, dass der Kraftüberträger nur wenige Millimeter sinken kann. Damit kann eine sichere Zweifragment-Fraktur erzeugt werden, und der intramedulläre Kraftträger wird nicht deformiert.



a.



b.



c.

Abbildung 3: a. Schema des Frakturapparates b. Lagerung eines Versuchstieres in der Vorrichtung c. Erzeugen der Fraktur

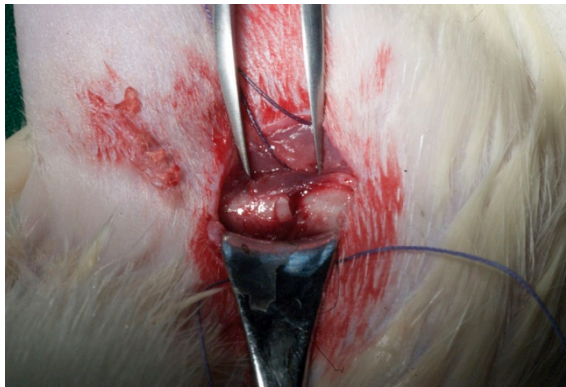
2.4.4 Einbringen der Kollagenmembran

Nach Applikation des Traumas wurde ein neuer chirurgischer Zugang geschaffen (Abb. 4a). Zunächst wurde der Frakturspalt palpirt, dann ein lateraler Zugang unter Schonung der Muskulatur geschaffen. Der Musculus vastus lateralis wurde dorsal vom Septum intermuskuläre getrennt und abgehoben (Abb. 4b). Darunter ließ sich der Frakturspalt darstellen. Nun folgte das Einbringen der Kollagenmembran um den Frakturspalt, diese wurde mit zwei Fäden zirkulär fixiert (Abb. 4c). Abschließend folgte der Verschluss des zweiten operativen Zuganges mit resorbierbarem Nahtmaterial.

a.



b.



c.

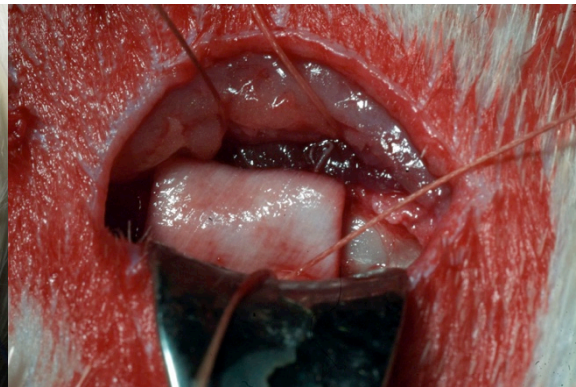


Abbildung 4: a. Lateraler Zugang zum Femur b. Darstellung der Fraktur c. Einliegende Kollagenmembran

2.4.5 Postoperatives Vorgehen

Nach Beendigung der Operation wurde die Narkose gewichtsadaptiert antagonisiert (Naloxon 0,12 mg/kg, Flumazenil 0,2 mg/kg, Atipamezol 0,75 mg/kg). Erneut erfolgte eine intraperitoneale Injektion. Die Tiere wurden bis zum sicheren Erwachen überwacht. Zur postoperativen Analgesie wurde dem Trinkwasser Metamizol (100 mg/kg) für drei bis fünf Tage zugesetzt.

Es erfolgte eine engmaschige Kontrolle der Vigilanz und der Atmung der Tiere. Es wurden täglich Verhalten, Mobilität und Nahrungsaufnahme der Tiere geprüft.

2.5 Versuchsabschluss und Präparation für Untersuchungen

Die Tiere wurden nach 14 Tagen oder nach 28 Tagen Standzeit in Kohlendioxid euthanasiert. Hierfür stand ein gasdichtes Behältnis bereit, das an eine Kohlendioxid-Gasflasche angeschlossen war. Die Tiere wurden dem Kohlendioxid für 5 Minuten ausgesetzt, anschließend erfolgte die Überprüfung der Vitalwerte.

Nach sicherem Eintritt des Herz-Kreislauf-Stillstandes wurde das rechte Femur entnommen und von Weichgewebe befreit. Der Knochen wurde für die weiteren Untersuchungen in Formalin fixiert.

2.6 Analysen

Die Mikro-Computertomographie (μ CT) wurde am Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC) der Klinik für diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

Die histologischen Untersuchungen wurden im Labor der experimentellen Unfallchirurgie und dem histologischen Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

2.6.1 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die Mikro-Computertomographische Untersuchung erfolgte mit dem vivaCT 40 (Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz). Ausgewertet wurden die Daten mit der Software μ CT Evaluation Program Version 6.5-1 (Sanco Medical, Bassersdorf, Switzerland).

Alle Knochen wurden in Falcon-Tubes gelagert und gescannt:

Nach einer Übersichtsaufnahme wurde für jeden Knochen ein Analysebereich gewählt, so dass der gesamte Kallus erfasst war. Der Analysebereich umfasste immer 1000 Schichten. Die Messungen wurden mit 70 kVp und

114 mA mit 1300 ms Integrationszeit und einer Voxelgröße von 10,5 μm durchgeführt.

Mit der Software μCT Evaluation Program konnten die so gewonnenen Daten nach unterschiedlichen Merkmalen ausgewertet werden.

Die μCT stellt die Dichten des untersuchten Materials nicht, wie in der Medizin gewohnt, in Hounsfield Units (HU) dar, sondern in Grauwerten. Die Grauwerte geben die Absorption von Röntgenstrahlung entsprechend dem linearen Schwächungskoeffizienten wieder. Sie werden in Tausendstel (‰) des maximalen Bildgraus angegeben.

Das Weichteilsignal wurde mit einem Graustufenfilter unterdrückt, so dass Knochen und Kallus sichtbar waren. Es wurden Schwellenwerte für den lamellären Knochen und für den Kallus definiert.

Bei der Untersuchung wurden nur Werte bis 800 Promille vom maximalen Grauwert berücksichtigt, um den Marknagel von der Messung auszuschließen. Hochgradig kalzifizierter Kallus und Lamellenknochen wurden mit den Grauwerten von 180 ‰ bis 269 ‰ definiert, kortikaler Knochen mit den Grauwerten von 270 ‰ bis 400 ‰ (Gabet et al., 2004).

Mit der Software ließen sich die einzelnen Grauwerte im Bild und im Histogramm farblich markieren (Abb. 5). Dadurch war eine Feinabstimmung der Grenzwerte möglich. Für jeden Scan wurden die Volumina der einzelnen Bereiche berechnet. So war ein quantitativer Vergleich der Kallusvolumina und der Knochen volumina möglich.

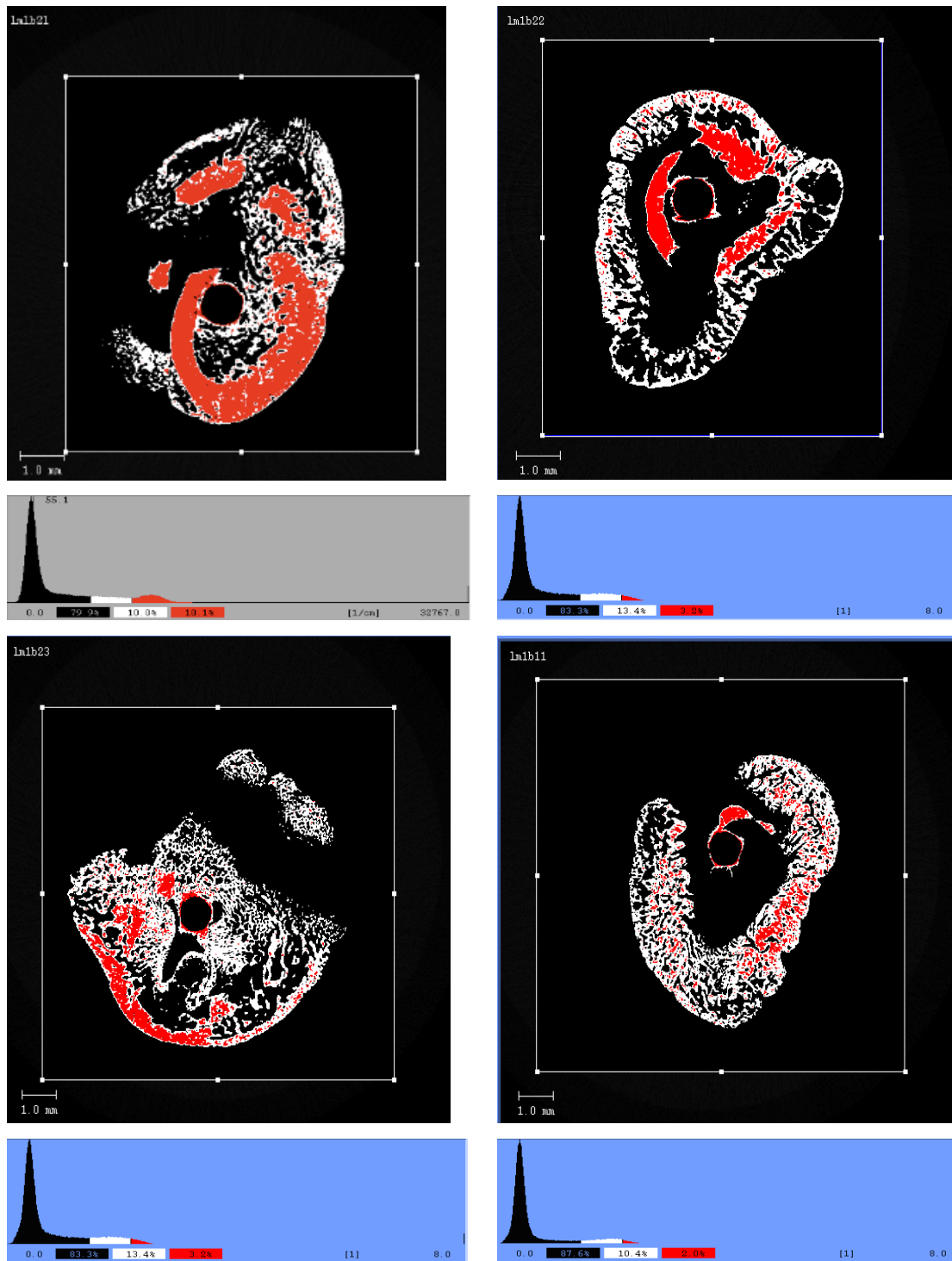


Abbildung 5: Transversalschnittbilder des knöchernen Kallus im μ CT. Die rot eingefärbten Bereiche entsprechen dem kortikalen Knochen. Die weiß eingefärbten Bereiche entsprechen nicht kalzifiziertem, neugebildetem Knochengewebe. Oben links BP 14 Tage, oben rechts Kontrollgruppe 14 Tage. Unten links BP 28 Tage, unten rechts Kontrollgruppe 28 Tage.

2.6.2 Histologie

Es wurden histologische Schnitte der Femurknochen angefertigt. Dabei wurden zwei Techniken verwendet. Zum einen die entklazifizierte Histologie, sowie Knochenhartschliffe.

2.6.2.1 Entklazifizierte Histologie

Ein Teil der Knochenproben wurde in 0,5 M EDTA bei pH 7,4 entkalzifiziert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte in einer Dicke von 5 Mikrometern mit einem Leica Mikrotom HM 430 (Microtom International GmbH, Walldorf, Deutschland) hergestellt. Diese wurden anschließend auf Superfrost plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Nachfolgend mussten die Schnitte vor der Färbung entparaffiniert werden. Dieser Prozess lief nach folgendem Schema ab:

1. Einlegen der Proben in Xylol für 3 x 3 Minuten
2. In 100 % Ethanol für 3 x 3 Minuten
3. In 90 % Ethanol für 2 x 3 Minuten
4. In 80 % Ethanol für 2 x 3 Minuten
5. In 70 % Ethanol für 1 x 3 Minuten
6. In 50 % Ethanol für 1 x 3 Minuten
7. Spülen mit Aqua dest. für 2 x 3 Minuten

2.6.2.2 Kalzifizierte Histologie

Bei dieser Methode werden die Proben nicht dekalzifiziert. Die Strukturen des Knochens bleiben somit erhalten.

Zur Darstellung der Knochenstruktur wurden die Proben in Polymethylmetacrylat (PMMA) (Sigma-Aldrich/ Fluka, St. Louis, USA) eingebettet.

Zur Vorbereitung wurden die Proben für die kalzifizierte Histologie in 10%igem gepuffertem Formalin fixiert. Je nach Größe der Probe sind hierfür 10 bis 14 Tage notwendig. Nachfolgend wurden die Proben mit Hilfe

ansteigender Ethanolreihen dehydriert und anschließend in Methylmetacrylate (MMA) eingebettet.

Dehydratation in ansteigender Ethanolreihe:

1. 60 % vergälltes Ethanol 2 Stunden
2. 80 % vergälltes Ethanol 2 Stunden
3. 90 % vergälltes Ethanol 4 Stunden
4. 96 % vergälltes Ethanol 5 Stunden
5. 100 % vergälltes Ethanol 4 Stunden
6. 1:1 Aceton : Ethanol 1 Stunden
7. 1:1 Aceton : Ethanol 4 Stunden
8. 100 % vergälltes Ethanol 1 Stunden
9. 100 % vergälltes Ethanol 4 Stunden
10. 100 % vergälltes Ethanol 3 Stunden
11. reiner Methacrylsäure-Methylester 10-24 Stunden
12. Einbettgemisch sofort über ca. 3 bis 5 Tage kühl gelagert.

Gefahren, die bei der Entwässerung auftreten können, sind: Zerreißen, Schrumpfen, Härten oder Lipidextraktion der Präparate (Romeis, 1989).

Es war unbedingt notwendig, das Einbettungsgemisch sofort nach der Einbettung kühl zu lagern. Bei zu warmer Lagerung bestand die Gefahr der zu frühen Auspolymerisation, was dazu geführt hätte, dass die Proben nicht mehr ausreichend hätten beurteilt werden können.

Es folgte die Einbettung in Kunststoff. Dazu wurden die Proben in einem Glasgefäß in das Einbettungsgemisch aus Metacrylat-Methylester, Weichmacher und einem Katalysator eingebettet. Eine Fixierung der Präparate auf dem Boden der Einbettungsgefäße war notwendig, um ein Abheben des Gewebes zu vermeiden.

Dann erfolgte die Polymerisation in einem warmen Wasserbad. Nach dem Aushärten wurde das Glasgefäß zerschlagen, um die Probe weiter zu verarbeiten.

2.6.2.3 Herstellung der Knochenhartschliffe

Um dünne Präparatscheiben zu erhalten, wurden die Präparate nach der Probenentnahme mit der Diamantbandsäge (Exakt, Norderstedt, Deutschland) weiter in quadratische Probenblöcke zugeschnitten. Die Oberfläche wurde poliert und der Probenblock auf einen mit Spezialfolie (Neschen, Bückeberg, Deutschland) beklebten Objektträger mit Sekundenkleber (Loctite[®], Henkel AG & Co. KGaA Düsseldorf, Deutschland) aufgeklebt.

Um eine Blasenbildung während der Trockenphase des Klebers zwischen Präparat und Objektträger zu vermeiden, wurden die Präparateblöcke mit Druck auf den beschichteten Objektträger angepresst. Anschließend wurden die Präparate mit Hilfe einer Vakuumpumpe in die Sägevorrichtung eingespannt. Es erfolgte das Einstellen der Schnittdicke, um ca. 200 µm dicke Präparate zu erhalten. Um die Solldicke von 40 µm für die Toluidinblaufärbung zu erreichen, wurden die Präparate mit der Schleifmaschine (Nassschleifpapier, 1200er, 2400er und 4000er Körnung) nass geschliffen. Mit Hilfe eines Handmessgerätes (Tesa / Etalon, Renens, Schweiz) wurde die Präparatdicke kontrolliert. Im Anschluss erfolgte die Politur per Hand. Bei zu hohen Drehzahlen der Schleifteller beziehungsweise zu hohem Anpressdruck der Präparate sind Schäden des Gewebes möglich. Um Schäden rechtzeitig zu erkennen, Schleifspuren zu entfernen und den Fortschritt bewerten zu können, erfolgte eine ständige Kontrolle unter dem Mikroskop.

Nach diesen Arbeitsschritten wurden die Proben mit Toluidinblau gefärbt.

2.6.2.4 Färbung mit Toluidinblau

Toluidinblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) ist ein basischer Thiazinfarbstoff. Mit dieser Färbemethode lassen sich unterschiedliche Gewebe im Labor einfach und schnell anfärben. In der Toluidinblaufärbung stellt sich die mineralisierte Hartgewebematrix blassblau dar. Zellen und Weichteilgewebe sind unterschiedlich blau, Knorpelmatrix und Mastzellengranula erscheinen metachromatisch rot-violett, und die verkalkte

Knochenmatrix ist dunkelblau gefärbt. Zur Färbung mit Toluidinblau wird die Technik nach Romeis modifiziert (Romeis, 1989). Zum Entkalken der Schliffoberfläche und zur Verbesserung der Anfärbbarkeit der Knochenmatrix wurden die Präparate für 2 bis 4 Minuten mit 0,1 %iger Ameisensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet und anschließend mit Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Anschließend wurden die Präparate für 60 bis 120 Minuten in 20 %iges Methanol (J. T.Baker, Phillipsburg, USA) eingelegt. Dies verbessert die Zell- und Weichgewebefärbung. Ein längeres Lagern kann zum Verquellen der Zellen führen. Es folgte weiteres Spülen mit Aqua dest. Danach wurden die Hartschliffpräparate für 3 Minuten in das filtrierte Toluidinblau eingelegt und anschließend erneut mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss fand die Differenzierung unter dem Mikroskop mit HCl-Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Toluidinblau statt, um die Strukturen optimal darzustellen.

2.6.2.5 Hämatoxylin-Eosin (H.E.) - Färbung

Bei diesem Verfahren wird mit Hämatoxylin negativ geladenes Gewebe, wie zum Beispiel die DNA des Kernchromatins oder die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, blau gefärbt und mit Eosin positiv geladenes, azidophiles Gewebe, wie zum Beispiel Eiweiße (Zytoplasma), je nach Einwirkungsdauer stärker oder schwächer rot gefärbt.

Zur Färbung wurden folgende Schritte durchlaufen:

Die Präparate wurden für 3 Minuten in saures Hämatoxylin nach Mayer eingetaucht (Neumeister, 2000). Anschließend wurden sie 10 Minuten unter fließendem, kaltem Leitungswasser gespült, dann wurden die Präparate für 30 Sekunden in 1% Eosin eingetaucht. Anschließend folgte ein kurzes Eintauchen zunächst in 70% Ethanol, dann in 80 % Ethanol und schließlich in 100 % Ethanol. Zuletzt wurden die Präparate mit alkohollöslichen Eindeckmitteln (Eukitt®, ORSAtec GmbH, Freiburg, Deutschland) und Deckgläsern bestückt.

3 Statistik

Die Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Informatik und Statistik des UKSH, Campus Kiel.

Die Gaus'sche Normalverteilung der gruppierten Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Statistische Unterschiede der Mittelwerte wurden mit Hilfe eines Wilcoxon-signed-rank Test bestimmt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant bewertet.

Alle Daten wurden repräsentativ als Mittelwert \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet.

Zur Auswertung und Graphenerstellung wurde die Software Prism 5 Vers. 5.0a (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) verwendet.

Die Ergebnisse der Mikro-Computertomographie wurden in Säulen aufgetragen. Diese Grafiken sind wie folgt definiert: Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert. Die Standardabweichung ist durch die oberen Querstriche repräsentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Studienausschlüsse

Insgesamt standen 55 Versuchstiere zur Verfügung, 35 behandelte Tiere und 20 Kontrolltiere. Drei Tiere starben an der Narkose, vermutlich an einer Überdosierung. Zwei weitere Tiere verstarben, bevor die geplante Standzeit erreicht wurde.

Weiterhin wurden 6 Tiere von der Studie ausgeschlossen, da hier eine Trümmerfraktur des Femur vorlag und nicht, wie gewünscht, eine Zweifragmentfraktur. Somit konnten insgesamt 44 Tiere in die Studie eingeschlossen werden, davon 18 Tiere in den Kontrollgruppen und 26 Tiere in den Studiengruppen (Abb.1).

4.2 Mikro-Computertomografie (μ CT)

In der Mikro-Computertomografie konnte eine signifikante Zunahme des Kallusvolumens ($p = 0,0034$) der behandelten Tiere nach 28 Tagen ($94,03 \text{ mm}^3 \pm 17,63 \text{ mm}^3$; $n = 14$) im Vergleich zu den Kontrolltieren ($63,43 \text{ mm}^3 \pm 21,49 \text{ mm}^3$; $n = 9$) nachgewiesen werden.

Es zeigt sich bereits nach 14 Tagen eine noch nicht signifikante ($p = 0,1264$) Zunahme des Kallusvolumens in den behandelten Tieren ($60,94 \text{ mm}^3 \pm 11,28 \text{ mm}^3$; $n = 12$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($52,85 \text{ mm}^3 \pm 16,58 \text{ mm}^3$; $n = 9$) (Abbildung 6).

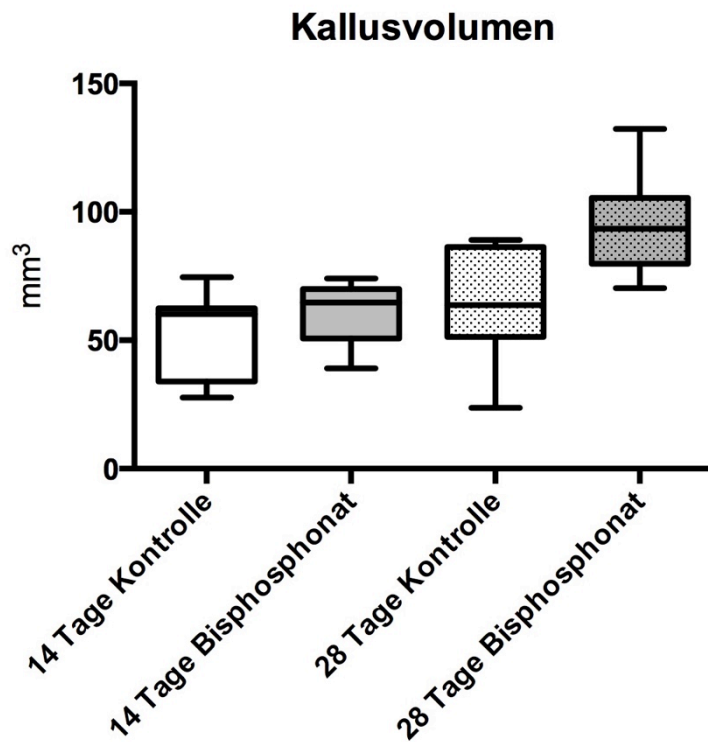


Abbildung 6: Volumina des Kallus in der Kontrollgruppe und in der Bisphosphonatgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten.

	14 d Kontr.	14 d BP	28 d Kontr.	28 d BP
Number of values	9	12	9	14
Minimum	27.65	39.04	23.61	70.31
25% Percentile	33.95	50.67	51.22	79.86
Median	60.15	64.63	63.58	93.50
75% Percentile	62.48	69.92	86.16	105.4
Maximum	74.56	74.09	89.00	132.3
Mean	52.85	60.94	63.43	94.03
Std. Deviation	16.58	11.28	21.49	17.63
Std. Error of Mean	5.528	3.255	7.165	4.713
Lower 95% CI	40.11	53.78	46.91	83.85
Upper 95% CI	65.60	68.11	79.96	104.2
Mean ranks	8.556	12.83	7.000	15.21

Tabelle 1: Deskriptive Statistik Kallusvolumen

14 Tage Kontrolle	14 Tage Bisphosphonat	28 Tage Kontrolle	28 Tage Bisphosphonat
74,5642	49,8274	88,9980	132,3368
61,1273	74,0948	23,6060	104,7609
37,7918	72,6572	66,5569	79,9388
59,3524	63,6158	83,4536	70,3087
62,4182	68,0347	88,8630	107,3276
62,5358	65,2301	53,4260	103,1725
60,1480	64,8167	63,5760	111,7036
27,6461	53,1779	50,9097	72,0712
30,1089	70,5519	51,5232	81,9469
	64,4484		79,6183
	39,0447		89,3398
	45,7963		97,6588
			81,8624
			104,3571

Tabelle 2: Datentabelle Kallusvolumen. Volumina in mm³.

Betrachtet man die Volumina des kortikalen Knochens, so zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ($28,14 \text{ mm}^3 \pm 10,71 \text{ mm}^3$; $n = 9$), dass das Volumen des kortikalen Knochens in der Bisphosphonatgruppe ($42,01 \text{ mm}^3 \pm 16,65 \text{ mm}^3$; $n = 12$) im Untersuchungsfenster nach 14 Tagen zunimmt (Abbildung 7). Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant ($p = 0,0579$).

Nach 28 Tagen gleichen sich die Kontrollgruppe ($61,94 \text{ mm}^3 \pm 20,95 \text{ mm}^3$; $n = 9$) und die Bisphosphonatgruppe ($60,52 \text{ mm}^3 \pm 25,08 \text{ mm}^3$; $n = 14$) weiter an. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht statistisch signifikant ($p = 0,4004$) (Abbildung 7).

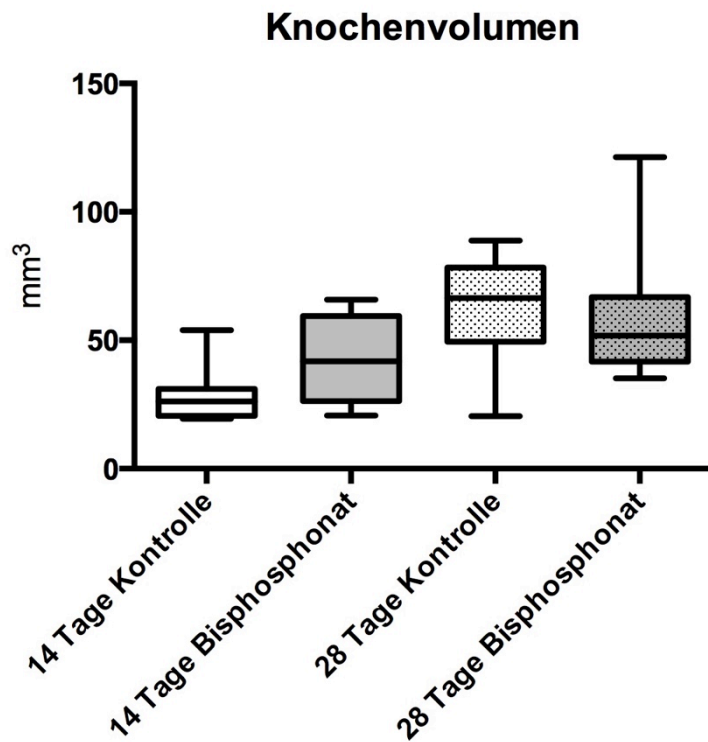


Abbildung 7: Volumina des Knochens im Untersuchungsfenster der Kontrollgruppe und Studiengruppe (BP) zu den Untersuchungszeitpunkten.

	14 d Kontr.	14 d BP	28 d Kontr.	28 d BP
Number of values	9	12	9	14
Minimum	19.45	20.75	20.48	35.14
25% Percentile	20.61	26.25	49.41	41.73
Median	26.22	41.77	66.40	51.81
75% Percentile	31.00	59.43	78.26	66.81
Maximum	53.93	65.75	88.82	121.3
Mean	28.14	42.01	61.94	60.52
Std. Deviation	10.71	16.65	20.95	25.08
Std. Error of Mean	3.569	4.806	6.982	6.703
Lower 95% CI	19.91	31.43	45.84	46.04
Upper 95% CI	36.37	52.59	78.04	75.00
Mean ranks	8.000	13.25	13.56	11.00

Tabelle 3: Deskriptive Statistik Knochenvolumen.

14 Tage Kontrolle	14 Tage Bisphosphonat	28 Tage Kontrolle	28 Tage Bisphosphonat
21,1549	34,5803	20,4796	53,1027
53,9292	42,9381	88,8188	104,7609
26,2247	65,7280	55,1068	78,1445
33,6273	26,1427	57,8370	50,5087
20,0673	48,8667	43,7047	40,7419
27,6295	47,4131	72,0906	35,1446
22,8111	20,7452	66,3965	39,5638
19,4534	40,5919	68,5592	61,3268
28,3783	21,8078	84,4284	42,0566
	26,5830		121,2945
	62,9502		49,8371
	65,7525		58,1044
			49,6576
			63,0300

Tabelle 4: Datentabelle Knochenvolumen (Volumina in mm³)

4.3 Histologie

In den angefertigten Histologien war eine regelrecht ablaufende Frakturheilung zu beobachten. In den Schnitten der behandelten Tiere zum späten Untersuchungszeitpunkt konnte jedoch ein verzögerter Umbau des fibrocartilären Kallus gesehen werden, Osteonekrosen wurden nicht nachgewiesen.

Die Beobachtung einer zunächst beschleunigten und in der Spätphase verzögerten Frakturheilung gleicht den beobachteten Effekten in der radiologischen Untersuchung.

Die Übersichtsaufnahmen (Abbildungen 8 - 14) zeigen, dass im Frakturspalt zunächst Knorpelgewebe zur Überbrückung entsteht. Insgesamt ist der Knochen im Bereich des Bruches aufgetrieben, und es lassen sich die einzelnen Gewebe gut gegeneinander abgrenzen.

In den Detailaufnahmen aus den Frakturspalten (Abbildungen 15 - 18) gewinnt man einen Eindruck der hier am Heilungsprozess beteiligten Zellen. So sieht man, abhängig von der Schnittebene, zum einen reichlich Chondrozyten (Abb. 15 und 17). In dem kortikalen Knochen sind die Osteozyten (Abb. 18) gut abzugrenzen. Im Frakturspalt selbst sind neben Fibroblasten (Abb. 15) zum Teil auch Lymphozyten sichtbar (Abb. 16 und 18).

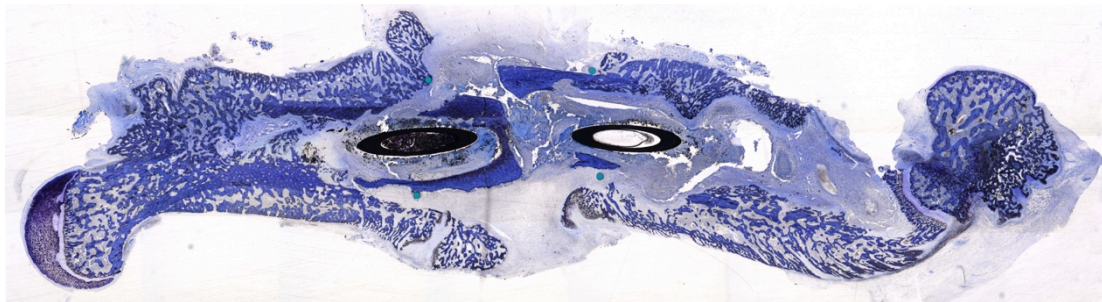


Abbildung 8: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 14 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). Gut sichtbar ist die Fakturzone und die Ausbildung eines knorpeligen Kallusgewebes. Anteilig ist das im Markraum einliegende Osteosynthesematerial erfasst. Hier sind die spongiösen Anteile des Femur gut erkennbar. Kortikalis ist nur am Caput femoris (links) und im Bereich der Fraktur sichtbar.

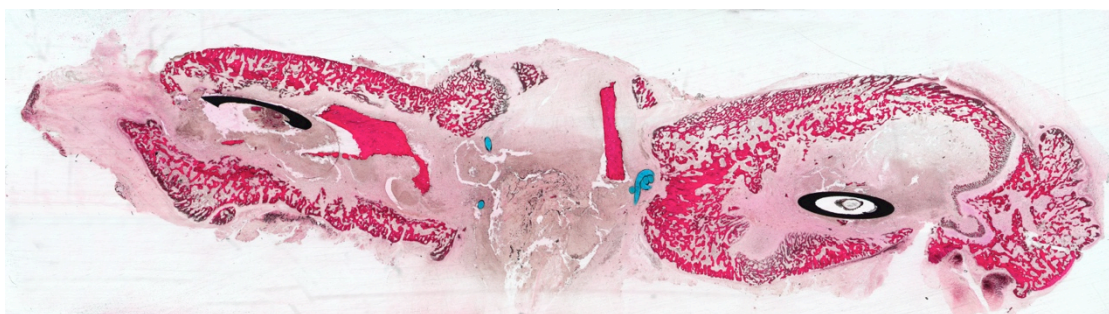


Abbildung 9: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 14 Tage, H.E.-Färbung (Hartschliff). Anteilig erfasstes intramedulläres Osteosynthesematerial. Im Bereich des Bruches liegt reichlich fibrocartilärges Kallusgewebe ein.

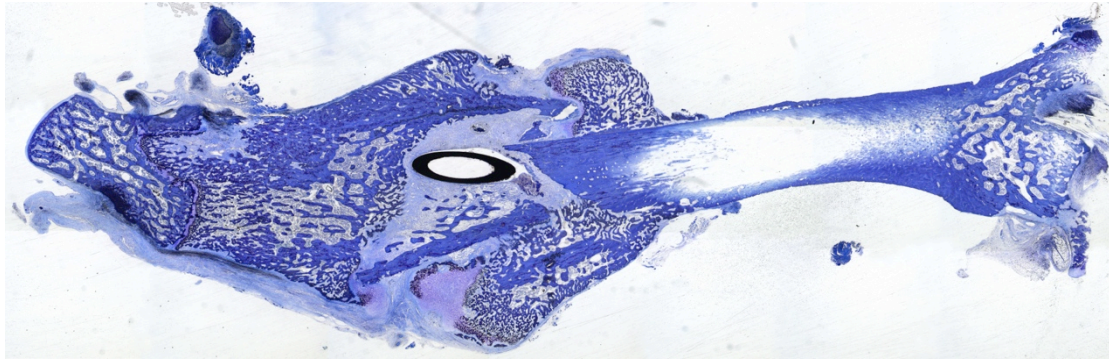


Abbildung 10: Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 14 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). Hier ist die knochenbruchnahe Auftreibung des Knochenumfangs gut sichtbar. Rechts im Bild ist vor allem kortikaler Knochen erfasst. Mittig Anteile des intramedullären Osteosynthesematerials. Die Bruchstelle wird durch reichlich fibrocartilärgen Kallus abgestützt. Anteilig ist die Textur des spongiösen Knochens mit erfasst.

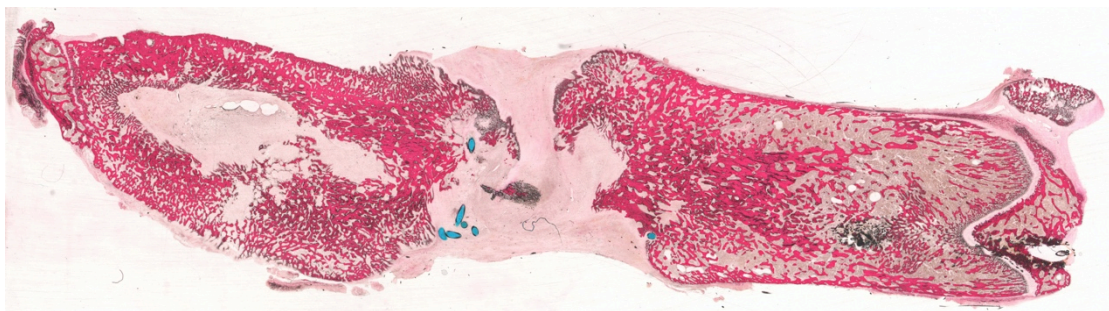


Abbildung 11: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 28 Tage, H.E.-Färbung (Hartschliff). Es stellt sich reichlich spongiöser Knochen dar. Kortikale Anteile sind in der Schnittebene nicht erfasst. Der Frakturspalt ist komplett mit Kallusgewebe durchbaut.

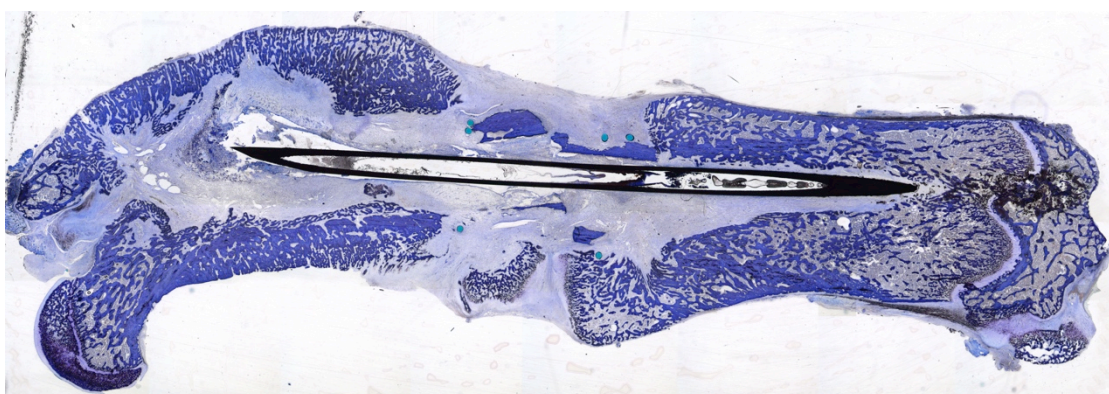


Abbildung 12: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 28 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). In dieser Schnittebene ist das intramedulläre Osteosynthesematerial gut sichtbar. Anteilig erfasste kortikale und spongiöse Knochenstrukturen. Im Frakturspalt reichlich Kallus und Reste von kortikalen Knochen.

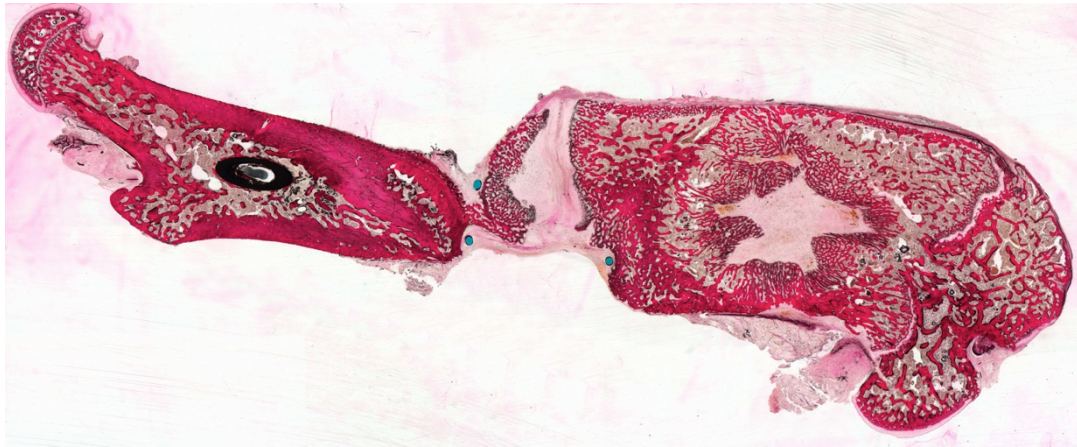


Abbildung 13: Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 28 Tage, H.E. Färbung (Hartschliff). Links im Bild sind Anteile des Marknagels angeschnitten. Es sind gut kortikale und spongiöse Knochenanteile sichtbar. In der Bruchzone liegt Kallus.

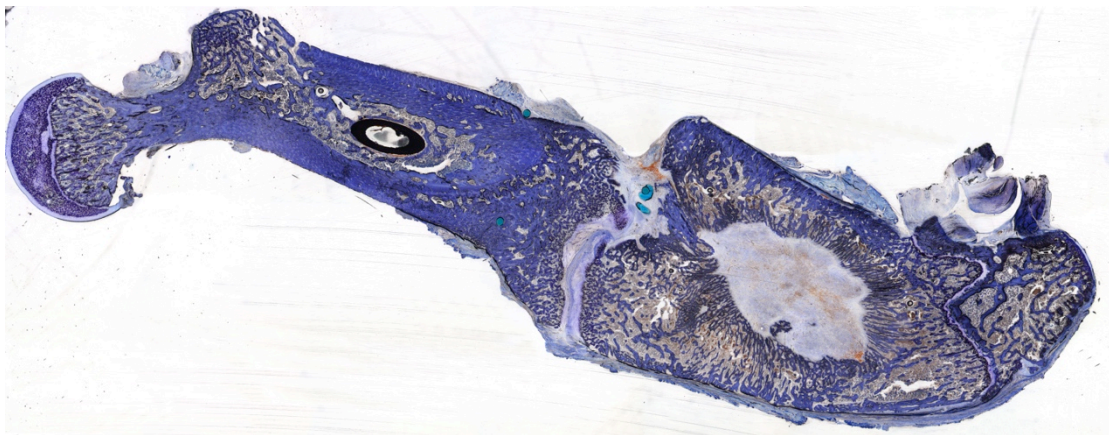


Abbildung 14: Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 28 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). In dieser Schnittebene ist gut zu sehen, wie der Frakturspalt überbaut wird.

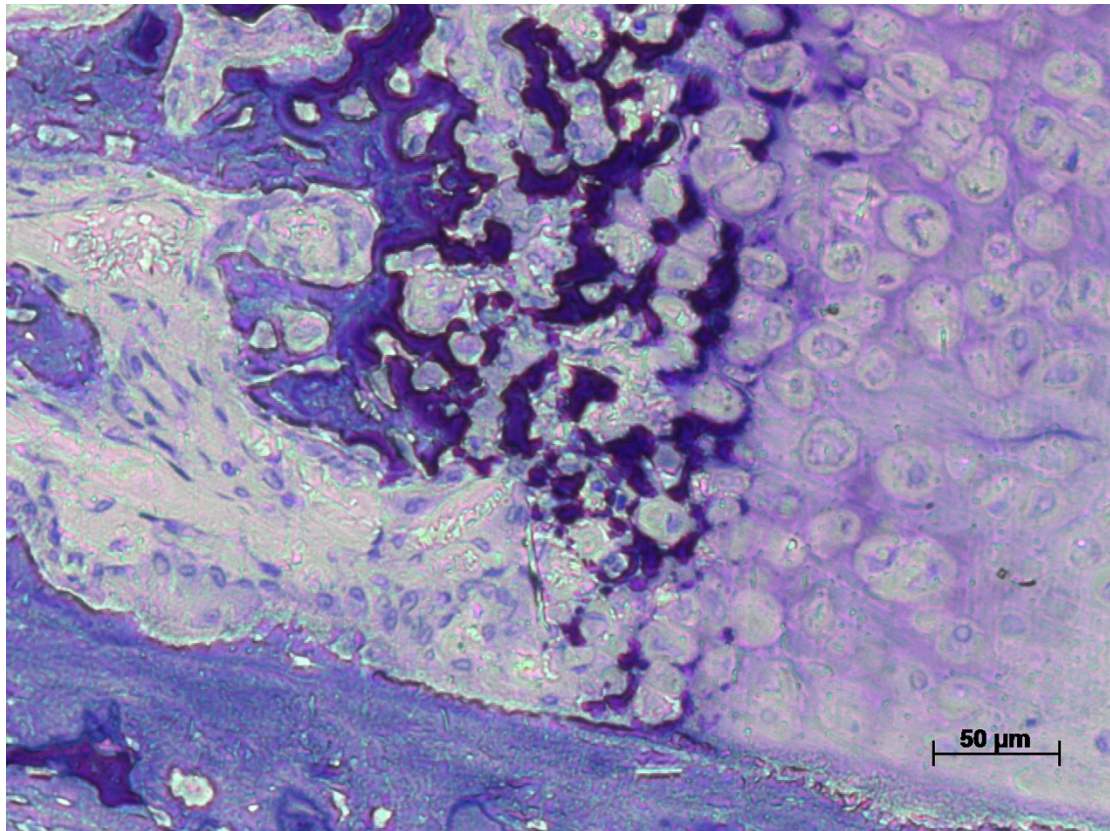


Abbildung 15: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (14 Tage Bisphosphonatgruppe). In dieser Detailaufnahme sind reichlich Fibroblasten und Chondrozyten sichtbar. Mit erfasst sind Anteile der Kortikalus und des trabekulären Knochens.

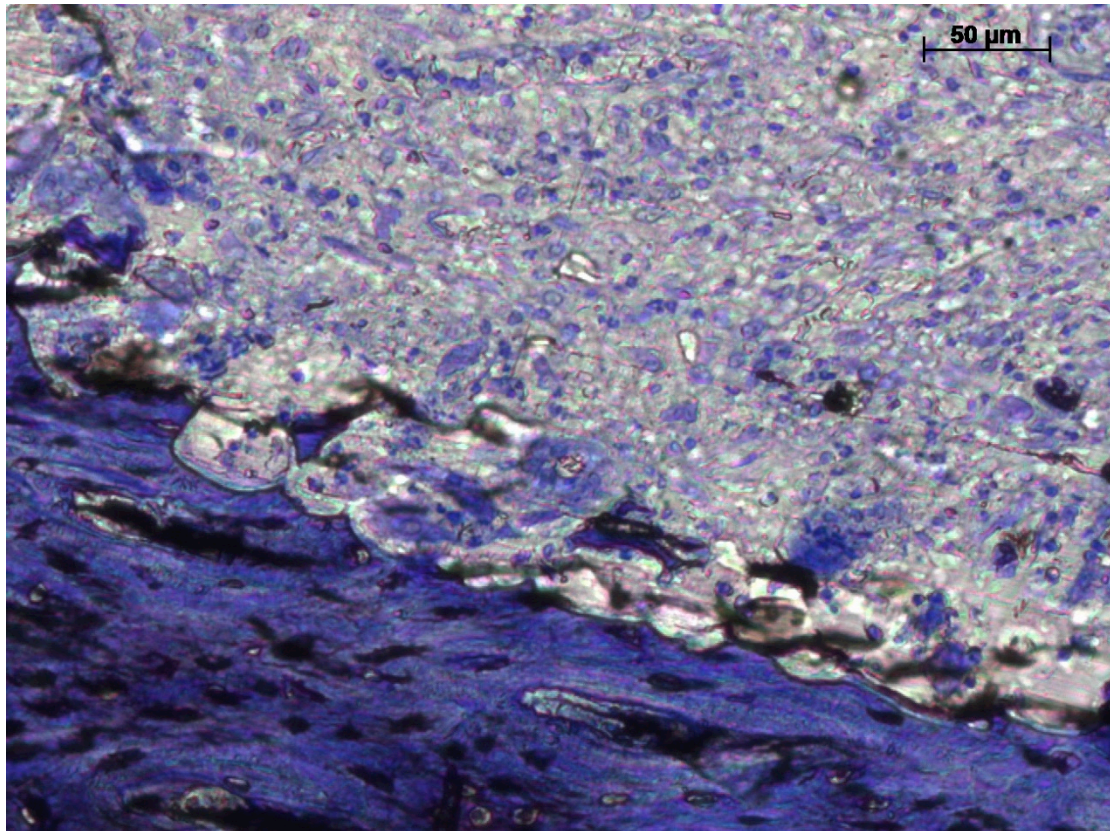


Abbildung 16: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (14 Tage Kontrollgruppe). Unten Anteile der Kortikalis. Oben reichlich Fibroblasten und bindegewebige Matrix.

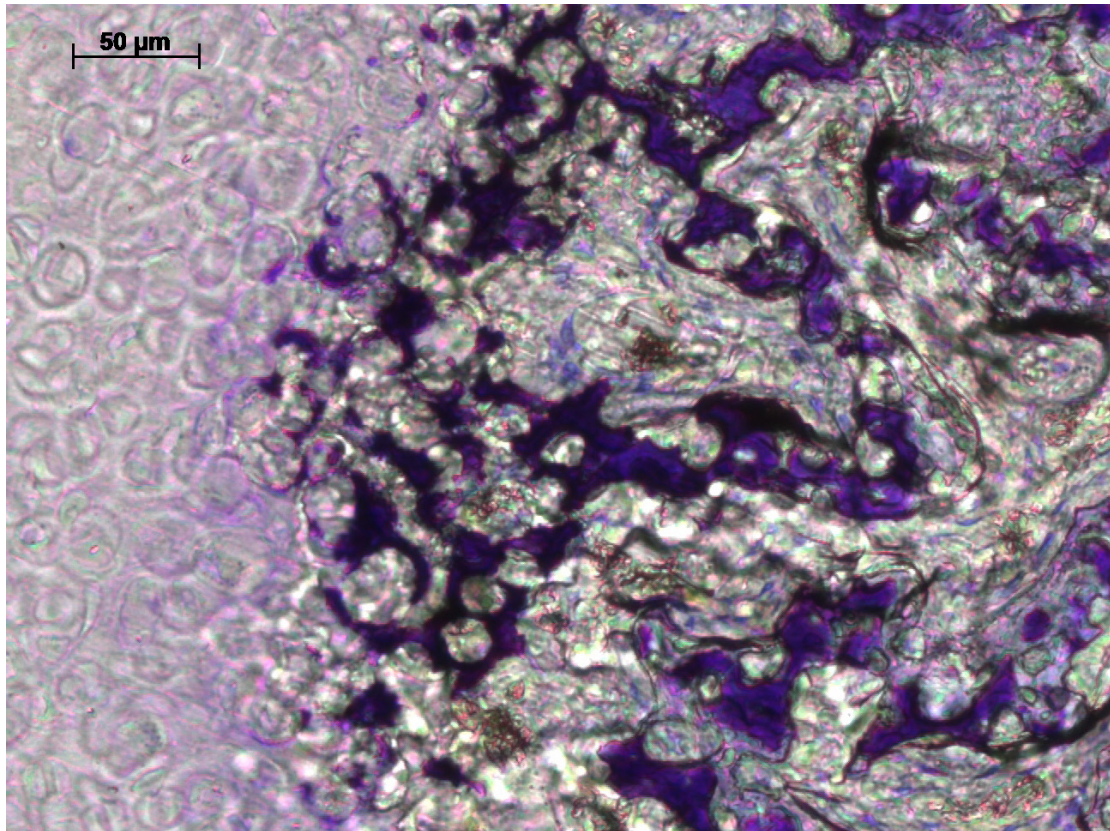


Abbildung 17: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (28 Tage Bisphosphonatgruppe). Links reichlich Chondrozyten und im rechten Teil des Schnittes Knochen trabekel und Kallus.

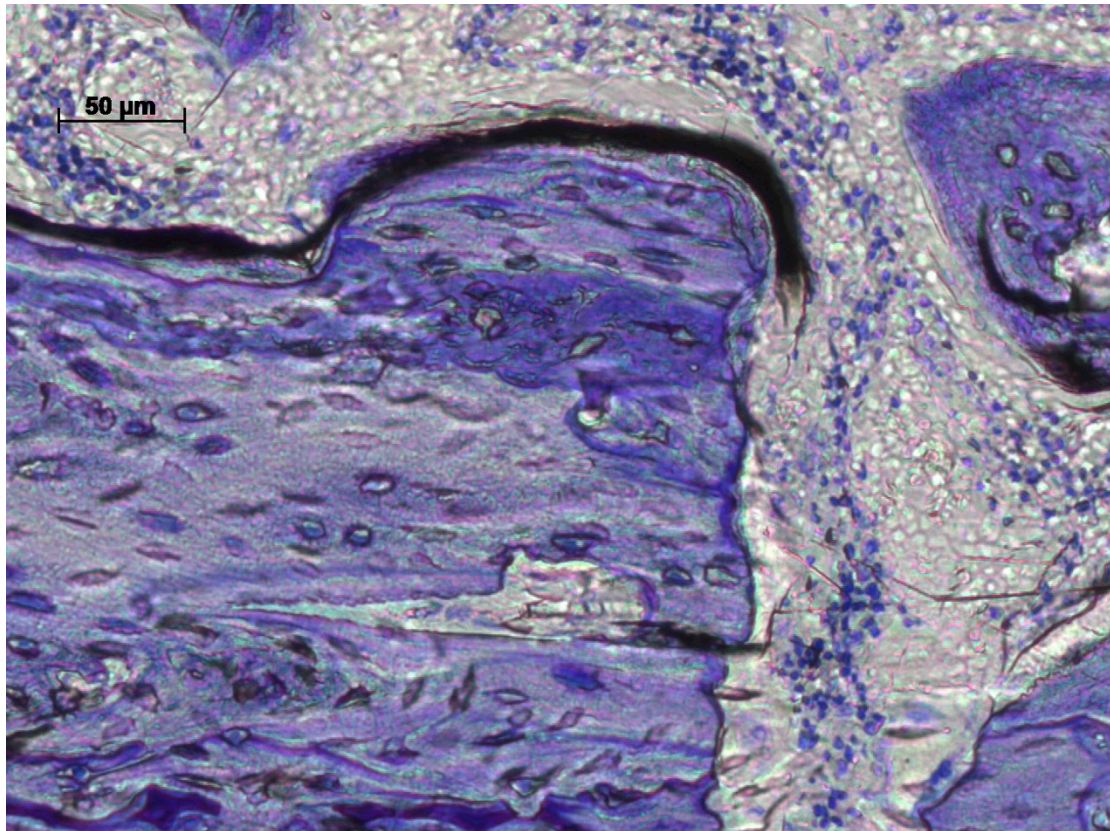


Abbildung 18: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (28 Tage Kontrollgruppe). Bruchkante der Kortikalis. Reichlich Fibroblasten und Lymphozyten. Schwarz stellt sich der Abrieb des Marknagles dar.

5 Diskussion

5.1 Diskussion des Versuchsaufbaus

5.1.1 Kleintiermodell

Für diese Studie wurde das Kleintiermodell aus mehreren Gründen gewählt. Im Vordergrund stand zum einen, dass das Frakturmodell in der Ratte schon lange etabliert ist (Bonnarens and Einhorn, 1984). Die guten Erfahrungen mit diesem Nagetiermodell machen dies attraktiv. Das etablierte Modell erhöht die Vergleichbarkeit dieser Studie mit vorangegangenen und nachfolgenden Studien.

Zum anderen sind Nagetiere in der Pflege und Haltung deutlich weniger aufwändig als vergleichbare Versuchstiere. Zudem sind die Kosten für die Tiere und deren Haltung vergleichsweise gering.

Zu berücksichtigen ist, dass die Frakturheilung in der Ratte wesentlich schneller vonstatten geht als im menschlichen Organismus (Einhorn, 2005). Dies stellt einen Vorteil dieses Modells dar, da die Standzeiten der Tiere verkürzt sind.

Wie in jedem Tiermodell stellt sich die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Gerade in Bezug auf den Knochenstoffwechsel wird eine hohe Übereinstimmung zwischen Mensch und Ratte berichtet (Bagi et al., 2006).

5.1.2 Frakturmodell

Das Modell einer standardisierten geschlossenen Fraktur in der Ratte ist schon seit 1984 etabliert. Vorteil dieser Methode ist die leichte Reproduzierbarkeit der Frakturen, eine geringe Rate an Trümmerfrakturen und ein sehr geringes Weichteiltrauma (Bonnarens and Einhorn, 1984).

Dies bestätige sich auch im Versuchsaufbau der hier vorgestellten Studie. Keines der Tiere wies eine offene Fraktur auf. Zu Trümmerfrakturen kam es nur vereinzelt ($n = 6$), diese Tiere wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Ein weiterer Vorteil ist der geringe technische Aufwand, um das Trauma zu applizieren.

5.2 Diskussion der angewandten Methoden

5.2.1 Mikro-Computertomografie (μ CT)

Die Mikro-Computertomografie ist ein Standardverfahren in der Beurteilung von Dichten und Volumina verschiedener Gewebe. Die Dichten lassen Rückschlüsse auf Art und Qualität des Gewebes zu. Die hochauflösende Bildgebung wird vor allem in der Osteoporose-Forschung eingesetzt, da sich mit Hilfe des μ CT die Trabekelstruktur des Knochens darstellen lässt.

Mittlerweile hat sich die μ CT Untersuchung als ein Standardverfahren in der Untersuchung von traumatologischen Fragestellungen etabliert (Shefelbine et al., 2005, Grongroft et al., 2009, Nyman et al., 2009).

Der große Vorteil dieser Methode ist die hochauflösende Visualisierung der Gewebestruktur bei gleichzeitiger Objektivierung der Dichte und des Volumens. So lassen sich visuelle Einschätzungen des Untersuchers mit objektiven Daten korrelieren.

5.2.2 Histologie

Die Histologie ist die Methode der Wahl, um zelluläre Strukturen und die Organisation der Extrazellulärmatrix zu untersuchen.

Nur hier ist eine Zelle bzw. ein Zellverbund genau beurteilbar. So können Rückschlüsse auf die an der Frakturheilung beteiligten Zellen und biologische Prozesse gezogen werden.

In der histologischen Begutachtung der angefertigten Schnitte zeigte sich in allen Gruppen eine regelrechte Knochenbruchheilung. Zunächst war eine Einwanderung von Fibroblasten mit nachfolgender Ausbildung von fibrösem Gewebe zu beobachten. Dieses wird in den späteren Untersuchungszeitpunkten durch Chondrozyten und Osteoblasten durchsetzt. Vereinzelt ist eine beginnende Ossifikation nachzuvollziehen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es unter Bisphosphonatbehandlung zu einem vermehrten Kallusvolumen bei der Knochenbruchheilung kam.

In der Frühphase der Knochenbruchheilung entsteht zunächst der Kallus, welcher als ungeordnetes Gewebe die Grundmatrix für die spätere Verknöcherung bildet. Er bietet die erste stabile Verbindung zwischen den Fraktarenden. Dieser Vorgang erfolgt vor allem durch die Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. Durch die Hemmung der Osteoklasten wird deren hemmende Funktion auf die Osteoblasten reduziert. Somit kommt es zu einer vermehrten Osteoblastenaktivität mit vermehrter Kallusbildung.

Neben der direkten Hemmung der Osteoklasten spielt die Beeinflussung des RANK / RANKL / OPG - Signalweges durch das Bisphosphonat eine wesentliche Rolle (Findlay and Atkins, 2011).

Jedoch zeigt sich auch, dass nach 28 Tagen weniger Knochenvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden kann. Dies spricht für eine längerfristige Hemmung der Osteoklasten durch Pamidronat. Möglicherweise lässt sich die Wirkung in unserem Modell dadurch erklären, dass die Inhibition so lange anhält, wie das Pharmakon an Hydroxylapatitstrukturen haftet und von Osteoklasten in den

Resorptionslakunen aufgenommen werden kann. Setzen dann die wesentlichen Umbauvorgänge ein, können Bisphosphonate zum Teil mit in den Knochen eingebaut und somit unwirksam werden (Bartl et al., 2006). Durch diesen Einbau vermindert sich die Wirkstoffkonzentration an der Oberfläche des Knochens und weniger Osteoklasten können gehemmt werden. Somit kumuliert weniger Bisphosphonat intrazellulär. Es kommt zum Wirkungsverlust und die Osteoklastenaktivität normalisiert sich.

Dagegen steht vermeintlich die Tatsache, dass ein Havers'sches Remodelling ohne ausreichende Osteoklastenfunktion nicht stattfinden kann (Pazzaglia et al., 2007). Eine zu hohe Dosis in der lokalen Applikation könnte also prinzipiell auch die reparativen Vorgänge behindern. Die vorliegenden Ergebnisse stützen diese These jedoch nicht, da eine zumindest angedeutet vermehrte Kallusbildung vorlag. Ein Ausbleiben oder eine verminderte Reparatur im Initialstadium ließ sich in dieser Studie jedenfalls nicht zeigen.

Bisphosphonate haben eine Schlüsselposition in der Behandlung von Knochenstoffwechselstörungen und sind somit eine wichtige Säule in der Behandlung von Knochenerkrankungen wie der Osteoporose (Epstein, 2006, Fleisch, 1997) und des Morbus Paget (Kilcoyne and Heffernan, 2011).

Für diese Therapien werden die Bisphosphonate oral, subkutan oder intravenös appliziert. Hierbei zeigen sich verschiedene Probleme. Zum einen die geringe Bioverfügbarkeit (Hyldstrup et al., 1993) des Pharmakons und damit verbundene geringe Wirkstoffmengen am eigentlichen Wirkungsort. Die notwendigen hohen Dosen schaffen Probleme und Nebenwirkungen wie grippale Symptome (Monkkonen et al., 1998), gastrointestinale Störungen (Elliott et al., 1998) und Osteonekrosen (Savoldelli et al., 2007, Abtahi et al., 2012, Abu-Id et al., 2008, Agarwal and Rao, 2012, Akintoye and Hersh, 2012). Das Ziel der vorliegenden Studie war daher, zu überprüfen, ob sich durch lokale Applikation günstige Einflüsse auf die Kallusbildung zur schnelleren Frakturheilung einsetzen lassen, und ohne das Auftreten theoretisch möglicher systemischer Nebenwirkungen, da mit vergleichsweise sehr geringen Dosen gearbeitet werden kann.

Vorangegangene Studien zeigten, dass systemisch applizierte Bisphosphonate initial zu einer vermehrten Kallusbildung führen, jedoch die endgültige Knochenbruchheilung verzögern (Nyman et al., 1996, Peter et al., 1996, Tarvainen et al., 1994). Hierbei handelt es sich um Betrachtungen über längere Zeiträume.

In Vorstudien zeigte sich jedoch auch eine verlängerte endgültige Knochenbruchheilung bei der Behandlung mit Bisphosphonaten (Li et al., 2001).

Diesen Trend können wir mit der vorliegenden Studie auch für die lokal applizierten Bisphosphonate bestätigen. Da Pamidroant eine Halbwertszeit von 14 Tagen aufweist könnte auch nach 28 Tagen noch ein suffizienter Wirkstoffspiegel bestehen, der osteoklastäre Aktivität weiterhin beeinflusst. Es lässt sich also postulieren, dass unter Umständen eine Anpassung der Dosis oder auch der Einsatz kürzer wirksamer BP den anfänglichen günstigen Effekt auf die Kallusbildung ausnutzen könnte, um dann spätere Wirkungen, wie die Verzögerung der Konsolidierung zu umgehen. Für solche Anwendungen würde sich z.B. Alendronat eignen. Denkbar wären auch Pyrophosphate, oder Diphosphonate (z.B. Methylendiphosphonat) welche enzymatisch gespalten werden und somit schnell inaktiviert werden zu verwenden. Aus diesem Grund werden diese Substanzen vor allem in der Skelettszintigrafie als Tracer eingesetzt.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Studie zeigt, was vorangegangene Studien bereits nahelegten: die Bisphosphonatbehandlung erhöht das Kallusvolumen.

Sollte in einer Folgestudie eine erhöhte biomechanische Stabilität des Kallus nachgewiesen werden, so erscheint diese Therapie als sinnvoll. Die Nebenwirkungen sind auf Grund der geringen Dosis bei lokal applizierten Bisphosphonaten als gering einzuschätzen. Jedoch müssen auch diese in Langzeitstudien untersucht werden. In der hier vorgelegten Studie wurden die Tiere nicht auf Osteonekrosen des Unterkiefers untersucht. Es konnte gezeigt

werden, dass die lokale Applikation der Bisphosphonate mit geringerer Dosis einen positiven Effekt am Zielorgan hatte.

In Folgeuntersuchungen muss geklärt werden, ob die Verzögerung der endgültigen Frakturkonsolidierung in der lokalen Dosis des Bisphosphonats begründet ist. Sollten sich in weiteren Studien die positiven Effekte der Bisphosphonate auf die Frakturheilung bestätigen, so ist es denkbar, Oberflächen von Osteosynthesematerialien mit Bisphosphonaten zu beschichten oder Knochenzement mit Bisphosphonaten anzureichern. Dieser würde dann z.B. bei einer Ballonkyphoplastie in den durch eine osteoporotische Sinterungsfraktur verformten Wirbelkörper implantiert. Somit würden die Bisphosphonate direkt am Erkrankungsort eingesetzt, die systemischen Nebenwirkungen wären nicht zu erwarten, und es könnten geringere Dosen als bei der peroralen oder intravenösen Applikation verwendet werden.

Jedoch muss auch festgehalten werden, dass die lokale Applikation nicht die orale oder intravenöse Applikation komplett ersetzen kann, da Bisphosphonate bei einer osteoporotischen Erkrankung nicht erst nach dem Auftreten einer Fraktur in die Therapie eingeschlossen werden sollten. Ziel der Sekundärprophylaxe sollte immer das Vermeiden von Frakturen sein.

6 Zusammenfassung

Die Behandlung von Knochenbrüchen ist ein wichtiger Bestandteil der modernen Medizin. Trotz operativer Versorgung und optimaler Voraussetzungen kann die Biologie der Knochenbruchheilung nicht beschleunigt werden. Als Faustregel gilt, dass ein Knochenbruch nach 6 Wochen fest verheilt ist. Durch eine verzögerte Heilung können neue Probleme wie die Entstehung einer Pseudarthrose entstehen. Eine Immobilisierung der an die Fraktur angrenzenden Gelenke für einen längeren Zeitraum ist für den Patienten problematisch. Dies kann zum Einsteifen des Gelenkes führen und dauerhafte Bewegungseinschränkungen nach sich ziehen.

Eine weitere große Herausforderung in der Traumatologie ist die Behandlung von osteoporotischen Knochenbrüchen. Diese meist bei älteren Patienten auftretenden Brüche sind zum einen schwierig zu operieren, da sich in der minderen Knochenqualität Osteosynthesematerial nicht so gut wie gewohnt verankert. Zum anderen ist es gerade für ältere Patienten wichtig, früh mobilisiert zu werden, um das Risiko für Folgeerkrankungen wie Lungenentzündungen und Thrombosen zu reduzieren. Auch ist die Materiallockerung und somit die Insuffizienz der Osteosynthese ein bekanntes Problem bei osteoporotischen Frakturen.

Ziel ist die Entwicklung biologischer Augmentationstechniken, durch welche die Frakturheilung nach der operativen Therapie pharmakologisch beschleunigt werden kann, bzw. die mechanische Festigkeit früher erreicht wird. Dies ist die Grundidee hinter dem Versuch, die Knochenbruchheilung medikamentös zu unterstützen.

In dieser Studie wurde weiblichen Wistar Ratten eine standardisierte Oberschenkelquerfraktur appliziert. Der entstandene Bruch wurde durch einen intramedullären Kraftträger geschient.

Zusätzlich wurde auf dem Frakturspalt eine Kollagenmembran aufgebracht, welche mit Bisphosphonat getränkt war.

Es wurden zwei Untersuchungszeitpunkte gewählt, nach 14 Tagen und nach 28 Tagen, um die Frühphase und die Spätphase der Knochenbruchheilung unterscheiden zu können.

Zu den Untersuchungszeitpunkten wurden die histologische Untersuchung und die μ CT der Frakturregion durchgeführt.

Die Ergebnissauswertung ergibt, dass zum späteren Untersuchungszeitpunkt die mit Bisphosphonat behandelten Tiere ein statistisch signifikant größeres Kallusvolumen aufwiesen. Auch zum ersten Untersuchungszeitpunkt liegt bereits ein vermehrtes Kallusvolumen bei den behandelten Tieren vor. Diese Volumenvergrößerungen im Vergleich zu den mit Placebo (NaCl) behandelten Tieren ist zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht statistisch signifikant.

Das Knochenvolumen hingegen war zu keinem Untersuchungszeitpunkt in der Behandlungsgruppe signifikant erhöht. Dies kann ein Hinweis auf ein verzögertes Remodeling unter Bisphosphonattherapie sein.

Die Schlussfolgerung daraus ist, dass die Bisphosphonate einen positiven Effekt auf die Knochenbruchheilung zeigen. Jedoch kann in dieser Studie keine Aussage über die mechanische Stabilität des vermehrten Kallusvolumens getroffen werden. Wir konnten durch die histologische Untersuchung feststellen, dass es unter der Bisphosphonatbehandlung keine Osteonekrosen gab. Auch war nicht zu beobachten, dass der Kallus der behandelten Tiere morphologisch anders aufgebaut war als bei den nicht behandelten Tieren.

Weitere Studien sind notwendig um festzustellen, ob die verzögerte Knochenbruchheilung von der lokalen Dosis am Frakturspalt abhängig ist. Hierbei sollte auch die Nebenwirkung der Osteonekrose am Kieferknochen mituntersucht werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

^{99m}Tc	^{99m}Tc Technetium
Abb.	Abbildung
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Bisphosphonat
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
μCT	Mikrocomputertomograph
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HU	Hounsfield Units
Kg	Kilogramm
kVp	Photonenenergie
M	Mol
mA	Milliampere
ms	Millisekunde
μm	Mikrometer
MOIN CC	Molecular Imaging North Competence Center
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mm	Millimeter
n	Anzahl
NF- κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OPG	Osteoprotegerin
PDGF	Platlet-derived growth factor
PRP	Platelet Rich Plasma
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
RANK	Receptor Activator of the NF- κB
RANKL	Receptor Activator of the NF- κB - Ligand
TGF- β	Transforming growth factor beta

VEGF Vascular Epithelial Growth Factor
Vers. Version

8 Literaturverzeichnis

- ABTAHI, J., AGHOLME, F., SANDBERG, O. & ASPENBERG, P. 2012. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med*, 41, 494-9.
- ABU-ID, M. H., WARNKE, P. H., GOTTSCHALK, J., SPRINGER, I., WILTFANG, J., ACIL, Y., RUSSO, P. A. & KREUSCH, T. 2008. "Bisphossy jaws" - high and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Craniomaxillofac Surg*, 36, 95-103.
- AGARWAL, P. & RAO, N. N. 2012. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Indian J Dent Res*, 23, 107-11.
- AKINTOYE, S. O. & HERSH, E. V. 2012. Risks for jaw osteonecrosis drastically increases after 2 years of bisphosphonate therapy. *J Evid Based Dent Pract*, 12, 116-8.
- ATIK, O. S., GUNAL, I. & KORKUSUZ, F. 2006. Burden of osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*, 443, 19-24.
- BAGI, C. M., HANSON, N., ANDRESEN, C., PERO, R., LARIVIERE, R., TURNER, C. H. & LAIB, A. 2006. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone*, 38, 136-44.
- BARTL, R., BARTL, C. & TRESCKOW, E. V. 2006. *Bisphosphonat-Manual*, [s.l.], Springer-Verlag.
- BASARIR, K., ERDEMLI, B., CAN, A., ERDEMLI, E. & ZEYREK, T. 2009. Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants? *Int Orthop*, 33, 855-9.
- BLAIR, P. & FLAUMENHAFT, R. 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23, 177-89.

- BOLANDER, M. E. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200, 165-70.
- BONNARENS, F. & EINHORN, T. A. 1984. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 2, 97-101.
- CRUESS, R. L. & DUMONT, J. 1975. Fracture healing. *Can J Surg*, 18, 403-13.
- CURREY, J. D., BREAR, K. & ZIOUPOS, P. 1996. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *J Biomech*, 29, 257-60.
- DAYER, R., BADOUD, I., RIZZOLI, R. & AMMANN, P. 2007. Defective implant osseointegration under protein undernutrition: prevention by PTH or pamidronate. *J Bone Miner Res*, 22, 1526-33.
- EINHORN, T. A. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21.
- EINHORN, T. A. 2005. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*, 19, S4-6.
- ELLIOTT, S. N., MCKNIGHT, W., DAVIES, N. M., MACNAUGHTON, W. K. & WALLACE, J. L. 1998. Alendronate induces gastric injury and delays ulcer healing in rodents. *Life Sci*, 62, 77-91.
- EPSTEIN, S. 2006. Update of current therapeutic options for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Clin Ther*, 28, 151-73.
- ERIKSEN, E. F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, 219-27.
- FENG, X. & MCDONALD, J. M. 2011. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*, 6, 121-45.
- FINDLAY, D. M. & ATKINS, G. J. 2011. Relationship between serum RANKL and RANKL in bone. *Osteoporos Int*, 22, 2597-602.
- FINK, B. 2009. Revision of late periprosthetic infections of total hip endoprostheses: pros and cons of different concepts. *Int J Med Sci*, 6, 287-95.
- FLEISCH, H. 1993. Bisphosphonates in osteoporosis: an introduction. *Osteoporos Int*, 3 Suppl 3, S3-5.

- FLEISCH, H. 1997. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res*, 29, 145-50.
- FLEISCH, H. 2002. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*, 4, 30-4.
- FLEISCH, H. 2003. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J*, 12 Suppl 2, S142-6.
- FROST, H. M. 1989a. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*, 283-93.
- FROST, H. M. 1989b. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res*, 294-309.
- GABET, Y., MULLER, R., REGEV, E., SELA, J., SHTEYER, A., SALISBURY, K., CHOREV, M. & BAB, I. 2004. Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties. *Bone*, 35, 65-73.
- GLOWACKI, J. 1998. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, S82-9.
- GOVENDER, S., CSIMMA, C., GENANT, H. K., VALENTIN-OPRAN, A., AMIT, Y., ARBEL, R., ARO, H., ATAR, D., BISHAY, M., BORNER, M. G., CHIRON, P., CHOONG, P., CINATS, J., COURTENAY, B., FEIBEL, R., GEULETTE, B., GRAVEL, C., HAAS, N., RASCHKE, M., HAMMACHER, E., VAN DER VELDE, D., HARDY, P., HOLT, M., JOSTEN, C., KETTERL, R. L., LINDEQUE, B., LOB, G., MATHEVON, H., MCCOY, G., MARSH, D., MILLER, R., MUNTING, E., OEVRE, S., NORDSLETTEN, L., PATEL, A., POHL, A., RENNIE, W., REYNDERS, P., ROMMENS, P. M., RONDIA, J., ROSSOUW, W. C., DANEEL, P. J., RUFF, S., RUTER, A., SANTAVIRTA, S., SCHILDHAUER, T. A., GEKLE, C., SCHNETTLER, R., SEGAL, D., SEILER, H., SNOWDOWNE, R. B., STAPERT, J., TAGLANG, G., VERDONK, R., VOGELS, L., WECKBACH, A., WENTZENSEN, A., WISNIEWSKI, T. & GROUP, B. M. P. E. I. S. F. T. T. S. 2002. 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*, 84-A, 2123-34.
- GRONGROFT, I., HEIL, P., MATTHYS, R., LEZUO, P., TAMI, A., PERREN, S., MONTAVON, P. & ITO, K. 2009. Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union. *J Biomech*, 42, 2089-96.

- HYLDSTRUP, L., FLESCHE, G. & HAUFFE, S. A. 1993. Pharmacokinetic evaluation of pamidronate after oral administration: a study on dose proportionality, absolute bioavailability, and effect of repeated administration. *Calcif Tissue Int*, 53, 297-300.
- KAJIWARA, H., YAMAZA, T., YOSHINARI, M., GOTO, T., IYAMA, S., ATSUTA, I., KIDO, M. A. & TANAKA, T. 2005. The bisphosphonate pamidronate on the surface of titanium stimulates bone formation around tibial implants in rats. *Biomaterials*, 26, 581-7.
- KANAKARIS, N., GUDIPATI, S., TOSOUNIDIS, T., HARWOOD, P., BRITTEN, S. & GIANNOUDIS, P. V. 2014. The treatment of intramedullary osteomyelitis of the femur and tibia using the Reamer-Irrigator-Aspirator system and antibiotic cement rods. *Bone Joint J*, 96-B, 783-8.
- KELM, J., BOHRER, P., SCHMITT, E. & ANAGNOSTAKOS, K. 2009. Treatment of proximal femur infections with antibiotic-loaded cement spacers. *Int J Med Sci*, 6, 258-64.
- KILCOYNE, A. & HEFFERNAN, E. J. 2011. Atypical proximal femoral fractures in patients with paget disease receiving bisphosphonate therapy. *AJR Am J Roentgenol*, 197, W196-7.
- LI, C., MORI, S., LI, J., KAJI, Y., AKIYAMA, T., KAWANISHI, J. & NORIMATSU, H. 2001. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res*, 16, 429-36.
- LI, J., MORI, S., KAJI, Y., KAWANISHI, J., AKIYAMA, T. & NORIMATSU, H. 2000. Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res*, 15, 2042-51.
- MCCALDEN, R. W., MCGEOUGH, J. A., BARKER, M. B. & COURT-BROWN, C. M. 1993. Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am*, 75, 1193-205.
- MCKIBBIN, B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*, 60-B, 150-62.
- MEMEO, A., VERDONI, F., DE BARTOLOMEO, O., ALBISETTI, W. & PEDRETTI, L. 2014. A new way to treat forearm post-traumatic non-union in young patients with intramedullary nailing and platelet-rich plasma. *Injury*, 45, 418-23.

- MILAS-AHIC, J., PRUS, V., KARDUM, Z. & KOVACEVIC, I. 2014. [Pathophysiology of osteoporosis]. *Reumatizam*, 61, 65-9.
- MONKKONEN, J., SIMILA, J. & ROGERS, M. J. 1998. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci*, 62, PL95-102.
- NEUMEISTER, B., BESENTHAL, I., LIEBICH, H. 2000. □„Klinikleitfaden Labordiagnostik□“, München, Urban und Fischer Verlag.
- NYMAN, J. S., MUNOZ, S., JADHAV, S., MANSOUR, A., YOSHII, T., MUNDY, G. R. & GUTIERREZ, G. E. 2009. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. *J Biomech*, 42, 891-7.
- NYMAN, M. T., GAO, T., LINDHOLM, T. C. & LINDHOLM, T. S. 1996. Healing of a tibial double osteotomy is modified by clodronate administration. *Arch Orthop Trauma Surg*, 115, 111-4.
- OSTERMANN, P. A., HENRY, S. L. & SELIGSON, D. 1993. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. *Clin Orthop Relat Res*, 102-11.
- PATIL, S., HOLT, G., RABY, N., MCLELLAN, A. R., SMITH, K., O'KANE, S., BEASTALL, G. & CROSSAN, J. F. 2009. Prospective, double blind, randomized, controlled trial of simvastatin in human fracture healing. *J Orthop Res*, 27, 281-5.
- PAZZAGLIA, U. E., BONASPETTI, G., RODELLA, L. F., RANCHETTI, F. & AZZOLA, F. 2007. Design, morphometry and development of the secondary osteonal system in the femoral shaft of the rabbit. *J Anat*, 211, 303-12.
- PENN-BARWELL, J. G., MURRAY, C. K. & WENKE, J. C. 2014. Local antibiotic delivery by a bioabsorbable gel is superior to PMMA bead depot in reducing infection in an open fracture model. *J Orthop Trauma*, 28, 370-5.
- PETER, C. P., COOK, W. O., NUNAMAKER, D. M., PROVOST, M. T., SEEDOR, J. G. & RODAN, G. A. 1996. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res*, 14, 74-9.
- RAHN, B. A., GALLINARO, P., BALTENSBERGER, A. & PERREN, S. M. 1971. Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*, 53, 783-6.

- RENO, F., RIZZI, M., INVERNIZZI, M., MIGLIARIO, M. & CISARI, C. 2013. Low doses amino-bisphosphonates stimulate keratinocytes growth inactivating glucocorticoid receptor. *Eur J Pharmacol*, 721, 301-4.
- RODAN, G. A. 1998. Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31, 55-61.
- ROMEIS, B. 1989. Aufziehen der Schnitte und Vorbereitung zur Färbung. *Romeis Mikroskopische Technik*, 17, 168-178.
- SAMELSON, E. J. & HANNAN, M. T. 2006. Epidemiology of osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*, 8, 76-83.
- SAVILLE, P. D. & HEANEY, R. 1972. Treatment of osteoporosis with diphosphonates. *Semin Drug Treat*, 2, 47-50.
- SAVOLDELLI, C., LE PAGE, F., SANTINI, J., SCORTECCI, G. & ODIN, G. 2007. [Maxillar osteonecrosis associated with bisphosphonate treatment and dental implants]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 108, 555-8.
- SCHENK, R. & WILLENEGGER, H. 1964. [on the Histology of Primary Bone Healing]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*, 308, 440-52.
- SCHMALZRIED, T. P., KWONG, L. M., JASTY, M., SEDLACEK, R. C., HAIRE, T. C., O'CONNOR, D. O., BRAGDON, C. R., KABO, J. M., MALCOLM, A. J. & HARRIS, W. H. 1992. The mechanism of loosening of cemented acetabular components in total hip arthroplasty. Analysis of specimens retrieved at autopsy. *Clin Orthop Relat Res*, 60-78.
- SCHWARTZ, H. C. 2005. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, 1555-6.
- SHEFELBINE, S. J., SIMON, U., CLAES, L., GOLD, A., GABET, Y., BAB, I., MULLER, R. & AUGAT, P. 2005. Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis. *Bone*, 36, 480-8.
- TARVAINEN, R., OLKKONEN, H., NEVALAINEN, T., HYVONEN, P., ARNALA, I. & ALHAVA, E. 1994. Effect of clodronate on fracture healing in denervated rats. *Bone*, 15, 701-5.
- TSUBAKI, M., SATOU, T., ITOH, T., IMANO, M., YANAE, M., KATO, C., TAKAGOSHI, R., KOMAI, M. & NISHIDA, S. 2012. Bisphosphonate- and statin-induced enhancement of OPG expression and inhibition of CD9, M-CSF, and RANKL expressions via inhibition of the

Ras/MEK/ERK pathway and activation of p38MAPK in mouse bone marrow stromal cell line ST2. *Mol Cell Endocrinol*, 361, 219-31.

WANG, X., SHEN, X., LI, X. & AGRAWAL, C. M. 2002. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31, 1-7.

WERMELIN, K., SUSKA, F., TENGVALL, P., THOMSEN, P. & ASPENBERG, P. 2008. Stainless steel screws coated with bisphosphonates gave stronger fixation and more surrounding bone. Histomorphometry in rats. *Bone*, 42, 365-71.

WILLENEGGER, H., PERREN, S. M. & SCHENK, R. 1971. [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Chirurg*, 42, 241-52.

ZIOUPOS, P. & CURREY, J. D. 1998. Changes in the stiffness, strength, and toughness of human cortical bone with age. *Bone*, 22, 57-66.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Versuchstiere in die Studiengruppen.	14
Abbildung 2: a. Darstellung der Fossa intercondylaris b. Einbringen des Femurnagels c. Schematische Darstellung des Marknagels	17
Abbildung 3: a. Schema des Frakturapparates b. Lagerung eines Versuchstieres in der Vorrichtung c. Erzeugen der Fraktur	18
Abbildung 4: a. Lateraler Zugang zum Femur b. Darstellung der Fraktur c. Einliegende Kollagenmembran	19
Abbildung 5: Transversalschnittbilder des knöchernen Kallus im μ CT. Die rot eingefärbten Bereiche entsprechen dem kortikalen Knochen. Die weiß eingefärbten Bereiche entsprechen nicht kalzifiziertem, neugebildetem Knochengewebe. Oben links BP 14 Tage, oben rechts Kontrollgruppe 14 Tage. Unten links BP 28 Tage, unten rechts Kontrollgruppe 28 Tage.	22
Abbildung 6: Volumina des Kallus in der Kontrollgruppe und in der Bisphosphonatgruppe zu den Untersuchungszeitpunkten.....	29
Abbildung 7: Volumina des Knochens im Untersuchungsfenster der Kontrollgruppe und Studiengruppe (BP) zu den Untersuchungszeitpunkten.....	31
Abbildung 8: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 14 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). Gut sichtbar ist die Fakturzone und die Ausbildung eines knorpeligen Kallusgewebes. Anteilig ist das im Markraum einliegende Osteosynthesematerial erfasst. Hier sind die spongiösen Anteile des Femur gut erkennbar. Kortikalis ist nur am Caput femoris (links) und im Bereich der Fraktur sichtbar.....	33
Abbildung 9: Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 14 Tage, H.E.-Färbung (Hartschliff). Anteilig erfasstes intramedulläres	

- Osteosynthesematerial. Im Bereich des Bruches liegt reichlich fibrocartilärges Kallusgewebe ein.33
- Abbildung 10:** Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 14 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). Hier ist die knochenbruchnahe Auftreibung des Knochenumfanges gut sichtbar. Rechts im Bild ist vor allem kortikaler Knochen erfasst. Mittig Anteile des intramedullären Osteosynthesematerials. Die Bruchstelle wird durch reichlich fibrocartilärgen Kallus abgestützt. Anteilig ist die Textur des spongiösen Knochens mit erfasst..... 34
- Abbildung 11:** Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 28 Tage, H.E.-Färbung (Hartschliff). Es stellt sich reichlich spongiöser Knochen dar. Kortikale Anteile sind in der Schnittebene nicht erfasst. Der Frakturspalt ist komplett mit Kallusgewebe durchbaut.....34
- Abbildung 12:** Rattenfemur im Längsschnitt, Kontrollgruppe 28 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). In dieser Schnittebene ist das intramedulläre Osteosynthesematerial gut sichtbar. Anteilig erfasste kortikale und spongiöse Knochenstrukturen. Im Frakturspalt reichlich Kallus und Reste von kortikalen Knochen..... 34
- Abbildung 13:** Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 28 Tage, H.E. Färbung (Hartschliff). Links im Bild sind Anteile des Marknagels angeschnitten. Es sind gut kortikale und spongiöse Knochenanteile sichtbar. In der Bruchzone liegt Kallus.35
- Abbildung 14:** Rattenfemur im Längsschnitt, Bisphosphonatbehandlung 28 Tage, Toluidinblaufärbung (Hartschliff). In dieser Schnittebene ist gut zu sehen, wie der Frakturspalt überbaut wird. 35
- Abbildung 15:** Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (14 Tage Bisphosphonatgruppe). In dieser Detailaufnahme sind reichlich Fibroblasten und Chondrozyten sichtbar. Mit erfasst sind Anteile der Kortikalis und des trabekulären Knochens.36
- Abbildung 16:** Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (14 Tage Kontrollgruppe). Unten Anteile der Kortikalis. Oben reichlich Fibroblasten und bindegewebige Matrix. 37

Abbildung 17: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (28 Tage Bisphosphonatgruppe). Links reichlich Chondrozyten und im rechten Teil des Schnittes Knochen trabekel und Kallus. 38

Abbildung 18: Detailaufnahme aus dem Frakturspalt. Toluidinblaufärbung, Hartschliff (28 Tage Kontrollgruppe). Bruchkante der Kortikalis. Reichlich Fibroblasten und Lymphozyten. Schwarz stellt sich der Abrieb des Marknagles dar. 39

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Seekamp gilt mein herzlicher Dank für die geleistete Unterstützung und Ermutigung sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Sehr herzlich danke ich Priv. Doz. Dr. med. Sebastian Lippross für die Überlassung des Themas, die enge Begleitung im Tierlabor und die wissenschaftliche Betreuung beim Verfassen der vorliegenden Dissertation. Mit viel Geduld und Engagement stand er mir immer zur Seite.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. rer. nat. Glüer und Graeme Campbell [Ph.D.](#) vom Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC), sowie Dr. med. Nicolai Purcz aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH, Campus Kiel, für die Unterstützung bei den radiologischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Yahya Açil und Frau Gabriele Nessenius aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Campus Kiel für die freundliche Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen.

Für viele wertvolle Anregungen und den stetigen Austausch danke ich der Arbeitsgruppe der experimentellen Unfallchirurgie des UKSH Kiel: Dr. rer. nat. Nadine Steubesand, Katrin Lange.

Für die gute Pflege meiner Versuchstiere und stets guten Rat danke ich den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung des UKSH Kiel: Inga Gehlsen, Ines Jurgasch, Birgit Reichmann.

11 Versicherung

Ich, Leif Menzdorf, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung lokal applizierter Bisphosphonate auf die Heilung geschlossener Femurschaftfrakturen 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.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht ist und dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits führe.

Die dem Verfahren zu Grunde liegende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ist mir bekannt.

Hamburg, den 04. Oktober 2016

Leif Menzdorf

12 Tierversuchsgenehmigung

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein

Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn
Dr. Sebastian Lippross
Klinik für Unfallchirurgie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 7
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 26.02.2008
Mein Zeichen: V 312-72241.121-9 (23-3/08)

Herr Buttchereit
Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

24. April 2008

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Lippross,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3001), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Die Wirkung von topischen Biphosphonaten auf die
Frakturheilung im osteoporotischen Knochen der Ratte

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 162 Ratten verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 30. April 2010 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Dr. Sebastian Lippross

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 | poststelle@mllur.landsh.de
www.landesregierung.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte Dokumente

13 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vor- und Nachname	Leif Thorbjörn Menzdorf
Geburtsdatum	04. September 1981
Geburtsort	Schleswig
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Berufsausbildung / Berufserfahrung

Seit Februar 2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
2002 – 2005	Berufsausbildung zum Rettungsassistenten
2001 - 2002	Zivildienst Kreiskrankenhaus Eckernförde in der Abteilung für Anästhesiologie

Studium

November 2012	Approbation als Arzt
2006 – 2012	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

2001	Abitur Gesamtschule Eckernförde
------	---------------------------------