

ALGEMENE SAMENVATTING

De botten in ons lichaam vormen een uniek orgaan. Het benige skelet geeft het lichaam structuur en ondersteuning, beschermt onze vitale organen, herbergt het beenmerg en participeert in minerale homeostase. Bot is levend weefsel en wordt gekarakteriseerd door een constante aanpassing aan de mechanische belasting waaraan het onderhevig is. Botcellen zijn gevoelig voor krachten veroorzaakt door lichamelijke belasting. Mechanoreceptoren zetten lichamelijke belasting om in biochemische signalen die zorgen voor genexpressie en die cellulaire aanpassingen tot gevolg hebben. Fractuurgenezing is een complex proces waarbij de expressie van de juiste genen en rekrutering van de juiste cellen vereist is, op de juiste tijd en plaats. De meerderheid van fracturen geneest spontaan na de initiële operatieve dan wel conservatieve fractuurbehandeling. Vijf tot 10% van de fracturen laat echter vertraagde genezing zien. Het fractuurgenezingsproces kan beïnvloed worden door diverse stimuli, zoals groeifactoren, hormonen en mechanische belasting. Inzicht in de biologische processen betrokken bij fractuurgenezing heeft geleid tot nieuwe behandelingsopties om vertraagde en/of verstoorde fractuurgenezing te stimuleren, zoals bone morphogenic proteins (BMP), extra-corporeale shock wave, electrostimulatie en low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). LIPUS (30 mW/cm^2) is een vorm van micromechanische energie welke transcutaan wordt doorgegeven doormiddel van hoog frequente geluidsgolven. De door LIPUS afgegeven energie kan zodoende een alternatief vormen voor de mechanische belasting die normaal op de botten wordt uitgeoefend door lichamelijke belasting (ook wel bekend als de wet van Wolff). LIPUS laat versnelling zien van het fractuurgenezingsproces. Het stimulerende effect van LIPUS kan veroorzaakt worden door beïnvloeding van verschillende cellulaire processen in fractuurgenezing, zoals angiogenesis, chondrogenesis en intramembraneuze (desmale) of/en enchondrale verbening. Het exacte mechanisme waardoor LIPUS botgenezing beïnvloed is echter nog steeds onduidelijk. In het huidige proefschrift evalueren we de effectiviteit van LIPUS op de stimulatie van het vertraagde en/of verstoorde fractuurgenezingsproces op het weefselniveau, alsmede het effect op (versnelde) klinische consolidatie. Door meer duidelijkheid te krijgen omtrent het werkingsmechanisme van LIPUS alsmede de effectiviteit op fractuurgenezing, hopen we voorstellen te kunnen doen voor toekomstige klinische indicatie en/of gebruik. Onze hypothese luidt; LIPUS stimuleert en/of versnelt de vertraagde en/of verstoorde fractuurgenezing door beïnvloeding van de verschillende cellulaire processen en stadia van fractuurgenezing op weefsel niveau. Om onze hypothese te testen hebben we de volgende onderzoeksvragen gedeponneerd:

1. Is LIPUS effectief in de behandeling van nonunions van de tibia in de huidige klinische praktijk?

2. Is LIPUS als enige behandelingsoptie effectief in het versnellen en/of bevorderen van fractuurconsolidatie bij patiënten met een delayed union van de niet gefixeerde fibula osteotomie?
3. Op welke wijze beïnvloed LIPUS botgenezing op weefselniveau bij patiënten met een delayed union na osteotomie van de fibula?
4. Beïnvloed LIPUS behandeling de aanwezigheid van RUNX2-immunopositieve osteogene cellen in delayed unions na fibula osteotomie?
5. Zorgt LIPUS voor toename van de vasculariteit en bloedtoevoer in delayed unions na osteotomie van de fibula?
6. Ondersteunt het huidige wetenschappelijk bewijs het gebruik van LIPUS voor fractuurbehandeling. Zo ja, voor welke indicatie draagt LIPUS het meeste bij?

Om antwoord te vinden op onze onderzoeksvragen, zijn we gestart met het beoordelen van de effectiviteit van LIPUS behandeling op de consolidatie van (bewezen) tibia nonunions. Tibia nonunions komen relatief vaak voor en vormen voor de patiënt een grote beperking in het dagelijkse functioneren. Alle in Nederland met LIPUS behandelde tibia nonunions van januari 2000 tot februari 2003, werden geëvalueerd in een studie met self-paired opzet. LIPUS was de enige nieuwe behandelingsoptie en strikte criteria van inclusie zorgden voor een minimale spontane genezingstendens. In 52 van de 71 (73%) tibia nonunions zorgde LIPUS-behandeling voor genezing, hetgeen significant hoger is in vergelijking met de spontane genezing kans ($p < 0.0001$). Lange termijn follow-up laat een hoge therapie trouwheid zien en geen re-fracturen. LIPUS is daarom effectief in de behandeling van tibia nonunions en kan gezien worden als een goed, veilig en goedkoper alternatief dan operatieve behandeling (Chapter 2).

In vergelijking tot verse fractuurgenezing wordt een gerandomiseerde placebo gecontroleerde trial, welke het geïsoleerde effect van LIPUS onderzoekt, als onethisch gezien, omdat het met de placebo behandelde controlepatiënt weerhoudt van enige vorm van behandeling. De niet gefixeerde fibula osteotomie als onderdeel van een tibia kop osteotomie, laat een tendens zien van vertraagde genezing en vormt zo een uniek klinisch model welke het mogelijk maakt om een placebo behandeling te verrichten zonder negatieve en/of onethische consequenties. Door gebruik te maken van de delayed union van de niet gefixeerde fibula osteotomie als klinisch model, was het mogelijk om het geïsoleerde effect van LIPUS behandeling te onderzoeken op vertraagde en/of verstoorde fractuurgenezing in een gerandomiseerde dubbelblinde klinische trial. Uitkomsten laten geen verschil zien tussen het aantal genezen delayed unions behandeld met LIPUS ($n=7$) en zonder ($n=8$). Onafhankelijke radiologische beoordeling liet zien dat LIPUS de tijd tot consolidatie reduceerde met 29% (niet-significant) na 5 maanden behandeling en met 57% ($p=0.023$) 1 jaar na de start met LIPUS behandeling. LIPUS is daarom effectief in het versnellen van het genezingsproces in vertraagde en/of verstoorde fractuurgenezing. Bij gebruik van

LIPUS als enige behandelingsoptie zorgt LIPUS niet voor een verhoogd percentage fractuur consolidatie, indien voldoende stabiliteit niet is gewaarborgd, zoals bij de niet gefixeerde delayed union van de fibula (Chapter 3).

Het genezingsproces versnellende vermogen van LIPUS op fractuurgenezing, kan worden veroorzaakt door stimulatie van verschillende cellulaire processen betrokken bij fractuurgenezing en botvorming, zoals angiogenese, chondrogenese, en intramembraneuze en/of enchondrale verbening. Om een beter inzicht te krijgen hoe LIPUS vertraagde en/of verstoorde botgenezing beïnvloed, werden biopten verkregen van delayed unions van de fibula. Door gebruik te maken van histologische en histomorfometrische analyse, werden botvormings en resorptie parameters bepaald. In LIPUS behandelde delayed unions was er sprake van directe (desmale) botvorming alsmede indirecte botvorming met kraakbenige tussenfase, dit terwijl er in de controle groep alleen maar enchondrale verbening werd gezien. In het nieuw gevormde bot aangrenzend aan de fractuuruiteinde, laat LIPUS behandeling een significante toename zien van osteoid dikte met 47%, minerale appositie snelheid met 27% en botvolume met 33%. Er werd geen toename gezien in het aantal bloedvaten in het nieuw gevormde bot ten gevolge van LIPUS behandeling. Onze bevindingen suggereren dat LIPUS fractuurgenezing versneld in delayed unions van de fibula door middel van toegenomen osteoid dikte, minerale appositie snelheid en botvolume, hetgeen verhoogde activiteit impliceert van de osteoblasten aan de fractuuruiteinden. Toegenomen stabiliteit en/of verhoogde bloedtoevoer, maar geen toegenomen bloedvat vorming, kunnen de verschillen in verbeningstypen verklaren tussen LIPUS behandelde delayed unions en de onbehandelde controles (Chapter 4).

Osteogene cel proliferatie en differentiatie speelt een belangrijke rol in een adequaat fractuurgenezingsproces en is het uitgangspunt van osteoinductieve therapieën bij vertraagde botgenezing. Mechanische belasting kan de aanmaak van botweefsel stimuleren door een proliferatieve reactie of door een direct anabool effect op botcellen. RUNX2 is een transcriptie factor en het RUNX2-gen wordt gezien als het belangrijkste regulerende gen voor osteogene celdifferentiatie en botmatrix productie. Immunolocalisatie van RUNX2 als vroege botcelmarker is verricht om het effect van LIPUS op de aanwezigheid van osteogene cellen te bepalen in en nabij het nieuw gevormde bot aan de fractuuruiteinden en tot op 3 mm afstand van de fractuuruiteinden. LIPUS behandeling van fibula delayed unions zorgde voor een significante reductie in het aantal RUNX2 immunopositieve cellen in het beenmerg bij de fractuuruiteinden, terwijl het aantal RUNX2 immunopositieve cellen aan het botoppervlak niet veranderd was. Het aantal RUNX2 immunopositieve cellen was vergelijkbaar voor atrofische en hypertrofische delayed unions. Immunolocalisatie van RUNX2 positieve cellen in delayed unions van de fibula laat zien dat vertraagde klinische fractuurgenezing niet leidt tot verstoring van de osteogene cel proliferatie en/of differentiatie op weefsel niveau, zelfs als er sprake is van een atrofische

delayed union. Verminderd aantal RUNX2 immunopositieve osteogene cellen in het beenmerg in combinatie met onveranderd aantal RUNX2 immunopositieve cellen op het botoppervlak, impliceert dat LIPUS niet de osteogene cel populatie vergroot, maar hoogstwaarschijnlijk osteogene cel differentie beïnvloed (Chapter 5).

Vasculariteit is een zeer belangrijke factor in fractuurgenezing. Herstel van de bloed circulatie is essentieel in een vroeg stadium van fractuurgenezing. Vaatvorming is nodig voor botvorming. Nog steeds is grotendeels onbekend of LIPUS de vasculariteit stimuleert door vaatvorming en/of verhoogde bloedtoevoer naar het fractuurgebied in vertraagde en/of gestoorde fractuurgenezing. In coupes van bot bipten van delayed unions na fibula osteotomie, werden bloedvatvorming parameters bepaald en gerelateerd aan de botvorming parameters alsmede histomorphometrische karakteristieken. In vergelijking met placebo behandelde controles, was het totale volume aan bloedvaten verhoogd in de LIPUS-behandelde delayed unions. LIPUS zorgde niet voor een toename in het aantal bloedvaten, maar zorgde wel voor significant grotere bloedvaten. Geconsolideerde (genezen) delayed unions (LIPUS-behandelde en placebo behandelde controles) lieten een significante correlatie zien tussen bloedvat grootte en osteoid volume. Onze resultaten suggereren daarom dat LIPUS de vasculariteit stimuleert in delayed unions van de fibula, door toegenomen bloedtoevoer en perfusie, mogelijk gemaakt door vergroting van de bloedvaten. LIPUS laat alleen maar stimulering zien van fractuurgenezing bij patiënten die een positieve correlatie hebben tussen vascularisatie en osteoid volume op weefsel niveau, maar niet bij patiënten waar deze correlatie afwezig is (Chapter 6).

Evidence-based geneeskunde vormt een belangrijke basis voor de effectuering van klinische behandelingen en vormt een belangrijke richtlijn voor klinische behandelingen. Een algemene consensus over de effectiviteit, alsmede de indicatie voor gebruik van LIPUS voor fractuurgenezing blijft afwezig. Om kwalitatief hoogstaand bewijs te verkrijgen omtrent de helende werking van LIPUS, alsmede het indicatiegebied voor LIPUS fractuurbehandeling te specificeren, hebben we een systematische review en meta-analyse verricht van gerandomiseerde studies. In 9 studies was de tijd tot radiologische consolidatie de primaire uitkomstmaat. In deze studies, na pooling van de gezamenlijke patiënten populatie (n=402), zorgde LIPUS behandeling voor een significante verkorting van radiologische consolidatieduur ($p=0.0006$). LIPUS behandeling resulteerde in een gemiddelde tijdsreductie van 42.2 dagen (95% confidence interval 18.1 to 66.3 dagen; $I^2=94\%$; heterogeniteit $P<0.00001$). Slechts enkele studies rapporteerden het effect van LIPUS op functioneel herstel, maar konden geen positief effect objectiveren. Ondanks dat verkorting van de tijd tot radiologische consolidatie eerder functionele belasting mogelijk maakt, moeten toekomstige gerandomiseerde studies van hoge kwaliteit zich meer focussen op functionele uitkomstmaten om de totale klinische effectiviteit van LIPUS op fractuurgenezing vast te leggen (Chapter 7).

Concluderend, LIPUS behandeling zorgt voor een belangrijke bijdrage aan het optimaliseren van het fractuurgenezingsproces door verhoging van de botaanmaak en bloedtoevoer bij de fracturen met een vertraagde en/of lange genezingsduur. Hierdoor treedt een versnelling van het botgenezingsproces en consequente verkorting van de tijd tot consolidatie op. Co-factoren die een negatieve werking hebben op fractuur genezing, zoals onvoldoende stabiliteit, kunnen het positieve effect van LIPUS op fractuurgenezing teniet doen (Chapter 8).