

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

DISSERTATION

**Lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden mittels non-viralen  
Vektors zur Stimulation der Frakturheilung –  
eine histologische Untersuchung am Rattenmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ricarda Käthner, geb. Ganzert

aus Potsdam

Datum der Promotion: 04.09.2015

Meinen Eltern  
&  
Benjamin

Was Du nicht hast, dem jagst Du ewig nach,  
vergessend, was Du hast.

*William Shakespeare*

Enttäuschung ist das Ergebnis falscher Erwartungen.

*Andreas Tenzer*

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung/Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>Physiologische Grundlagen und Forschungsstand.....</b>	<b>10</b>
3.1.	Physiologische Knochenheilung .....	10
3.2.	Gestörte Knochenheilung .....	12
3.3.	Biologische Intervention zur Beeinflussung der Knochenheilung.....	14
3.4.	Gentherapie.....	20
3.5.	Die biodegradierbare Poly(D,L)-Laktid-Beschichtung .....	27
<b>4.</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>29</b>
4.1.	Arbeitshypothese .....	29
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
5.1.	Das Tiermodell .....	30
5.1.1.	Versuchstiere .....	30
5.1.2.	Gruppeneinteilung und Versuchsplan .....	30
5.2.	Implantat und Beschichtung .....	31
5.3.	Operatives Vorgehen, Blutentnahme und Röntgen .....	31
5.3.1.	Material.....	31
5.3.2.	Geräte .....	32
5.4.	Anästhesie und Operation.....	32
5.5.	Nachsorge und Untersuchungen.....	34
5.6.	Bestimmung der Serumparameter .....	35
5.7.	Radiologie.....	35
5.8.	Tötung und Knochenentnahme.....	35
5.9.	Histologische Untersuchung.....	36
5.9.1.	Knochenaufbereitung .....	36
5.9.2.	Herstellung der histologischen Schnitte .....	38
5.9.3.	Färben der histologischen Schnitte.....	39
5.9.4.	Digitalisierung und Auswertung mittels Bildanalyse.....	41
5.10.	Weitere Methoden des Projekts (Ergebnisse nicht Teil der Promotionsarbeit) .....	46
5.10.1.	Biomechanische Testung.....	46

5.10.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	46
5.11. Statistik .....	47
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
6.1. Versuchstoleranz der Tiere, klinischer Verlauf .....	48
6.2. Radiologische Ergebnisse .....	49
6.3. Histologie .....	51
6.3.1. Histomorphologische Ergebnisse .....	51
6.3.2. Histomorphometrische Ergebnisse .....	56
6.4. Biomechanische Ergebnisse .....	58
6.5. Ergebnisse der PCR .....	59
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
7.1. Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien .....	61
7.2. COPROGs .....	65
7.3. Die Poly[D,L-Laktid]-Beschichtung .....	67
7.4. Das Tiermodell .....	69
7.5. Klinische Relevanz und Ausblick .....	70
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>9. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung .....</b>	<b>84</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>86</b>
<b>11. Anhang .....</b>	<b>87</b>
11.1. Abkürzungsverzeichnis .....	87
11.2. Abbildungsverzeichnis .....	88
11.3. Tabellenverzeichnis .....	89
11.4. Publikationen .....	90
<b>12. Danksagung .....</b>	<b>91</b>

## 1. Zusammenfassung

Seit vielen Jahren wird versucht, die Frakturheilung mit Hilfe von Wachstumsfaktoren zu beschleunigen und somit Komplikationen zu reduzieren. Gegenwärtig wird BMP-2 als rekombinant humanes Protein im klinischen Einsatz lokal appliziert. Eine andere Applikationsart von Wachstumsfaktoren ist die Gentherapie. Eine Neuentwicklung nicht-viraler Vektoren sind sogenannte COPROGs (*Copolymer-protected gene vectors*). Polymere umhüllen das zu kodierende Plasmid und bieten unter anderem Schutz vor zu schnellem Abbau in der Zelle.

Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob die lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden in Form von COPROGs die Frakturheilung in einem Rattenmodell stimuliert. Für die vorliegende Studie dienten als Versuchstiere Sprague Dawley Ratten. Die Tiere wurden in 3 Versuchsgruppen eingeteilt, einseitig die Tibia frakturiert und intramedullär mit einem Kirschner-Titandraht stabilisiert. Eine vierte Gruppe diente zum Nachweis der Transfektion. Es fanden zu 2 Zeitpunkten (28. und 42. Tag postoperativ) Untersuchungen statt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die histologischen Ergebnisse analysiert. In anderen Teilen der Studie wurden biomechanische Untersuchungen als auch Untersuchungen zur Transfektion durchgeführt. In allen Teilen der Studie erfolgten radiologische Kontrollen, Kontrollen der Serumparameter, Gewichts- und Temperaturbestimmungen.

Die lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden zeigte in der histologischen Auswertung keinen signifikanten Vorteil der BMP-2-Gruppe gegenüber den anderen Versuchsgruppen nach 28 bzw. 42 Tagen. Einen Anhalt für eine fortgeschrittenere bzw. beschleunigtere Knochenheilung in der COPROGs+BMP-2 Gruppe ergab sich nicht. Histomorphologisch konnte in allen Gruppen ein ähnlicher Kallusaufbau nachgewiesen werden. Initial zeigte sich ein signifikant geringerer mineralisierter Anteil kortikal und periostal in der BMP-2-Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe am 28. Tag. Dieser Unterschied war am 42. Tag nicht mehr nachweisbar.

Radiologisch gab es ebenfalls keinen Hinweis auf einen initial schnelleren Heilungsbeginn der mit COPROGs+BMP-2 behandelten Frakturen verglichen zur Kontrollgruppe.

Die biomechanischen Untersuchungen zeigten ein signifikant erhöhtes maximales Drehmoment in der BMP-2-Gruppe am 42. postoperativen Tag. Die Transfektionsfähigkeit der COPROGs wurde bestätigt, ohne dabei eine systemische Expression des Reportergens hervorzurufen.

Die Transfektionseffizienz non-viraler Vektorsysteme ist bekanntermaßen geringer als die viraler Vektorsysteme. Dies könnte einer der Gründe der nicht eindeutigen Ergebnisse sein. Ein weiterer Grund ist möglicherweise eine zu niedrige BMP-2-Plasmid-Konzentration in der PDLLA-Beschichtung.

Allerdings ist die Sicherheit non-viraler Vektoren hervorzuheben, die durch Teile der Studie bestätigt werden konnte.

Als eine der ersten *in vivo*-Studien mit COPROGs ist diese Wegbereiter für weitere Untersuchungen. Für die Zukunft ist zu überlegen, andere Trägermaterialien bzw. Konzentrationen von COPROGs+BMP-2 zu nutzen, um die positiven Ergebnisse der *in vitro*-Versuche als auch der biomechanischen Untersuchungen mit der Histomorphometrie zu stützen und sichere Behandlungsstrategien für die klinische Anwendung zu entwickeln.

### **Abstract**

For many years, it has been attempted to accelerate fracture healing by using growth factors to reduce complications. Currently the recombinant human protein BMP-2 is locally applied in clinical use. Another possibility for the application of growth factors is gene therapy. A new type of non-viral gene vectors is called COPROGs. Here, polymers encase the plasmid which is to be encoded, and offer protection from unduly rapid degradation in the cell.

The aim of the study was to investigate whether the local application of BMP-2 plasmids in the form of COPROGs in a rat model stimulates fracture healing. For the study at hand, Sprague Dawley rats have been used. The animals were divided into three experimental groups, on one side the tibia was fractured and stabilized with an intramedullary K-titanium wire. Another group was used to detect transfection. Examination took place twice. In the present study, the histological findings were analyzed. Biomechanical testing was also carried out. Radiological controls, controls of the serum parameters, and weight and temperature measurements were tested throughout the experimental period.

Local application of BMP-2 plasmids showed no significant advantage of the BMP-2 group compared to the other experimental groups after 28 and 42 days.

In the histological examinations, no advanced or accelerated bone healing for COPROGs+BMP-2 treated animals were shown, compared to the control group. The morphology of the callus region did not show any significant differences between the three groups. On day 28 after fracture, a significantly less mineralized area was recorded in the BMP-2 group both cortical and periosteal, compared to the control group. This difference was no longer seen on day 42.

Applying radiological parameters, there was no indication of an initial rapid healing of the treated COPROGs and BMP-2 fractures, compared to the control group.

The biomechanical studies have shown a significant increase in the maximum load in the BMP-2 group on day 42 after fracture. The transfection ability of COPROGs was confirmed without causing a systemic expression of the reporter gene.

The inconclusive results may possibly be caused by an insufficient concentration of BMP-2 plasmid in the PDLLA coating.

The transfection efficiency of non-viral vector systems is known to be relatively lower than the viral vector systems. However, the safety of non-viral vectors should be emphasized, as confirmed by this study.

As one of the first in vivo studies with COPROGs, this study paves the way for further research. It may then be worth considering the use of other carrier systems or different concentrations of COPROGs and BMP-2, in order to confirm the positive results of the in vitro experiments as well as the biomechanics studies with histomorphometry and to develop safe treatment strategies for clinical application.

## 2. Einleitung

Weltweit sind Erkrankungen und Verletzungen des Bewegungsapparates die häufigste Ursache für Behinderungen und chronische Schmerzen. Es leiden mehrere hundert Millionen Menschen unter diesen Krankheiten, die enorme Kosten für das Gesundheitswesen und die Gesellschaft bedeuten. Diese Zahl wird durch die deutliche Zunahme der Älteren in der Bevölkerung rapide zunehmen.

In Deutschland werden mehr als die Hälfte aller Frauen und 15% aller Männer älter als 65 Jahre eine osteoporotische Fraktur erleiden.

Erkrankungen und Verletzungen des Bewegungsapparates stehen in Deutschland an erster Stelle aller Arztkontakte. Sie sind Ursache für 40 % aller Arbeitsunfähigkeiten, 40 % aller verlorenen Arbeitsjahre sowie 25 % aller frühzeitigen Berentungen. In Deutschland wurden allein die direkten Kosten im Jahr 2002 durch Verletzungen des Haltungs- und Bewegungsapparates auf mehr als 10,5 Mrd. EURO geschätzt [<http://www.boneandjointdecade.de>].

Ähnliche Zahlen liefern die USA. Laut dem Musculoskeletal injury report 2000 wurden 7,9 Millionen Frakturen gezählt, davon 5-10% mit verspäteter oder unzureichender Knochenheilung [Musculoskeletal injury report 2000, AAOS]. Nach Herz-Kreislaufkrankungen sind Traumata das zweitteuerste medizinische Problem in den USA. Die damit verbundenen Kosten belaufen sich auf 56 Milliarden \$, wobei etwa die Hälfte für die Behandlung von Knochenbrüchen verwendet wird [National Trauma Data Bank Report 2002].

Die Heilung von Frakturen stellt einen komplexen physiologischen Prozess dar, der durch Interaktionen von Zellen, Hormonen, Zytokinen, extrazellulären Matrixproteinen sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren reguliert wird [Einhorn 1998].

Auf Grund von Störungen des Heilungsprozesses kann es zu Komplikationen in Form verzögerter Konsolidierung oder Infektionen kommen. Störungen der Frakturheilung können *traumatisch*, *mechanisch* als auch *biologisch* bedingt sein. Trotz großer Fortschritte in den vergangenen Jahren ist die Behandlung von Frakturen weiterhin mit Komplikationen (z. B. Pseudarthrosen, Non-unions) und Risiken verbunden [Einhorn 1998, Marsell 2011].

Die Entwicklung neuer sowie die Optimierung bestehender Implantatsysteme trug aus biomechanischer Sicht im Wesentlichen zur Verbesserung der Behandlung von Frakturen in den letzten Jahrzehnten bei. Weiterhin bestehende Behandlungsprobleme lassen das Hauptaugenmerk auf die Lösung der Probleme biologischer Natur richten.

Seit vielen Jahren wird versucht, die Frakturheilung mittels lokal oder systemisch wirkender Faktoren zu beeinflussen und zu beschleunigen und somit Komplikationen zu reduzieren. Der

Einsatz von Wachstumsfaktoren stellt hierbei einen möglichen Lösungsansatz dar. Für den Patienten würde der Einsatz von Wachstumsfaktoren und die damit verbundene Beschleunigung der Frakturheilung eine Verringerung der komplikationsbedingten Folgeoperationen bedeuten sowie eine Verkürzung der Behandlungsperiode mit einem frühzeitigeren Wiedererlangen der Arbeitsfähigkeit, Reduzierung der Erwerbsminderung oder Frühberentung und damit einen großen Gewinn an Lebensqualität darstellen. Zugleich könnten die Kosten für das Gesundheitswesen bezüglich des Krankenhausaufenthaltes, der Nachbehandlung sowie Kosten für Hilfsmittel gemindert werden.

Sehr potente Wachstumsfaktoren im Rahmen der Knochenbildung und -regeneration sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte der osteoinduktive Effekt von BMP gezeigt werden [Alden 1999; Baltzer 2000; Betz 2007; Bonadio 1999; Chen 2003; Fang 1996; Rose 2003; Wildemann 2004].

Gegenwärtig befindet sich neben BMP-2 (INFUSE® Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, U.S.A. und InductOs®, Wyeth, Münster, Deutschland) auch BMP-7 (Osteogenic Protein-1, OP-1) (Osigraft®, Olympus Europa, Hamburg, Deutschland) im klinischen Einsatz. Beides sind rekombinant humane Proteine, die über Trägermaterialien appliziert werden. Der Nachteil dieser Proteine ist die kurze Halbwertszeit, sowie die kostenintensive Herstellung. Des Weiteren kann es durch die Fremdeiweiße zu immunologischen Antworten des Organismus kommen.

Eine mögliche Alternative ist die Gentherapie. Die Vorteile dieser Strategie sind beispielsweise die länger anhaltende Expression des gewünschten Proteins sowie die zeitliche als auch quantitative Steuerung der Expression des Proteins. Der Einsatz von spezifischen Gewebepromotoren eröffnet die Möglichkeit den Expressionsort der applizierten Gene zu kontrollieren. Im Vergleich zum Einsatz von rekombinanten Proteinen reicht teilweise die einmalige Applikation der Gene aus um eine Therapie erfolgreich durchzuführen. Außerdem stellt die Gentherapie in der Behandlung von Erbkrankheiten die Methode der Wahl dar [Evans 2012].

### 3. Physiologische Grundlagen und Forschungsstand

#### 3.1. Physiologische Knochenheilung

Die physiologische Frakturheilung ist ein komplexer Vorgang, an dem verschiedene Zellen und Gewebstypen beteiligt sind. Die Vorgänge werden durch Interaktionen von Zellen, Hormonen, Zytokinen, extrazellulären Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren reguliert [Einhorn 1998, Dimitriou 2005]. Im Unterschied zu anderen Geweben, die meist durch Ausbildung einer bindegewebigen Narbe ausheilen, kann bei der Frakturheilung der Knochen als ursprüngliches Gewebe und dessen Funktion in der Regel nahezu vollständig wiederhergestellt werden [McKibbin 1978]. Die Knochenheilung kann in eine direkte – bei Spaltbrüchen und Plattenosteosynthesen mit Kompression vorkommend ohne Ausbildung eines Kallus – und in eine indirekte Frakturheilung unterschieden werden. Die klinisch relevante indirekte Frakturheilung wird in fünf sich teilweise überlappende Phasen unterteilt (Abb. 1) [Barnes 1999, Einhorn 1998].

- *Verletzung-/Frakturphase mit Hämatombildung (a)*
- *Entzündungsphase*
- *Angiogenese und Chondrogenese (b)*
- *Chondrale und desmale Ossifikation (b, c)*
- *Phase des Umbaus (sog. „remodeling“) (d)*

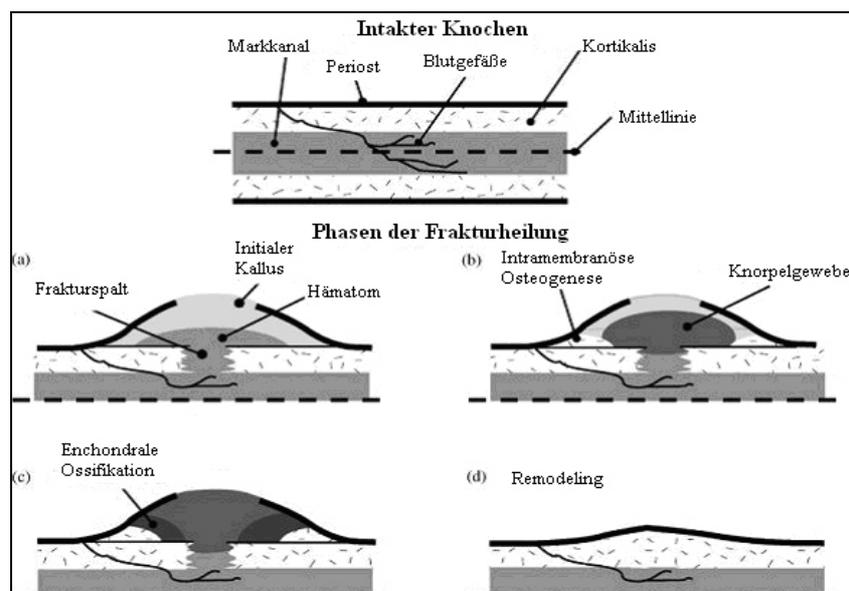


Abb. 1: Phasen der Knochenheilung (nach Bailon-Plaza et al.) [Bailon-Plaza 2001]

Die *Frakturphase* umfasst die Zerstörung des Knochens und teilweise des umgebenen Gewebes. Hierbei werden Kortikalis, Knochenmark, Periost sowie angrenzende Weichteile beschädigt. Im Frakturbereich kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms [Barnes 1999]. In das Hämatom infiltrieren in der anschließenden *Entzündungsphase* lokal Granulozyten, Mastzellen und Monozyten. Des Weiteren finden sich pluripotente Stammzellen mesenchymaler Herkunft als Vorläufer der Osteoblasten. Es kommt zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (u. a. TGF- $\beta$ 1, PDGF) und Zytokinen (Interleukin 1 und 6 u. a.), die für die Steuerung der Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung eine zentrale Rolle spielen und als Signalstoffe den Heilungsprozess entscheidend beeinflussen [Einhorn 1998].

2-3 Tage nach Abklingen der Entzündungsphase kommt es zum Aufbau von Granulationsgewebe. Nach 4-6 Wochen liegt ein sogenannter weicher Kallus vor, der von zentral nach peripher zur Frakturzone fortschreitet. Einen bedeutenden Beitrag zur Ausbildung des weichen Kallus und zum Ablauf der desmalen Ossifikation leisten hierbei die Mesenchym- und Osteoprogenitorzellen des Periosts. Sie differenzieren sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu Chondrozyten oder Osteoblasten [Lee FY 1998]. Nach etwa 3-4 Monaten ist ein Geflechtknochen entstanden, welcher durch allmähliche Umbauprozesse, sog. Remodelingvorgängen, in lamellären Knochen umgewandelt wird. Zum Abschluss der Umbauvorgänge entsteht aus dem Geflechtknochen wieder ein Lamellenknochen mit Periost und Endost. Die *Phase des Remodelings* beinhaltet die Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur mit Markraum und sollte bei regelhaftem Heilungsverlauf nach 6-24 Monaten abgeschlossen sein. Diese Vorgänge werden unter anderem von folgenden lokal wirksamen Wachstumsfaktoren gesteuert [Dimitriou 2005, Al-Aql 2008]:

*Transforming growth factors (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3)* werden von Thrombozyten unmittelbar nach einer Fraktur gebildet und initiieren die Kallusbildung. Außerdem werden sie in Chondrozyten und Osteoblasten gebildet und induzieren die Bildung von Extrazellulärmatrix. Des Weiteren stimulieren sie die Bildung von Mesenchymzellen.

*Bone morphogenetic proteins (BMPs)* werden von mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Chondrozyten gebildet und stimulieren deren Proliferation. BMP-2 ist eines der potentesten BMPs zur Stimulation der Zelldifferenzierung und ist ein wichtiger Faktor in der initialen Reparaturkaskade bei der Frakturheilung.

Insulin-like growth factors (IGF-I, IGF-II) stammen aus der Knochenmatrix, endothelialen Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten. IGF-I ist potenter als IGF-II und wird bei der Frakturheilung exprimiert, während IGF-II eine wichtige Rolle in der enchondralen Knochenbildung spielt.

Fibroblast growth factors ( $\alpha$ -FGF,  $\beta$ -FGF) fördern die Bildung von Fibroblasten, Myozyten, Osteoblasten und Chondrozyten.  $\alpha$ -FGF bewirkt dabei die Chondrozytenproliferation, während das potentere  $\beta$ -FGF sowohl in der Reifung der Chondrozyten als auch bei der Knochenresorption involviert ist.

Platelet derived growth factor (PDGF) steigert die Proliferation und Migration von Osteoblasten und wird von Osteoklasten gebildet. Demzufolge kommt ihm eine wichtige Rolle bei der Frakturheilung zu.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) wird von Osteoblasten gebildet und spielt in der Frakturheilung eine zentrale Rolle bei der Neoangiogenese.

### **3.2. Gestörte Knochenheilung**

Erfahrungen aus dem klinischen Alltag zeigen, dass es bei Frakturen zu bedeutenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen und sozioökonomischen Problemen für den Patienten kommen kann. Störungen der Frakturheilung können *traumatisch*, *mechanisch* als auch *biologisch* bedingt sein. Häufig lässt sich eine Kombination dieser Faktoren beobachten. Trotz großer Fortschritte unfallchirurgischer Therapiestrategien in den vergangenen Jahren ist die Behandlung von Frakturen weiterhin mit zahlreichen Komplikationen und Risiken verbunden [Baltzer 2004, Einhorn 1998, Fang 1996, Kaito 2005].

Die Komplikationen der Frakturheilung langer Röhrenknochen wurden von Coles *et al.* analysiert. In 13 Studien mit insgesamt 895 Patienten und verschiedenen Stabilisierungsmethoden fanden sich beispielsweise bei der unaufgebohrten Tibianagelung in 17,2% der Fälle eine verzögerte Konsolidierung bzw. Pseudarthrose, Fehlheilung in 11,8%, in 0,5% der Fälle kam es zu Infektionen und 23,1% der Patienten benötigten eine Reoperation [Coles 2000]. Neben den möglichen Operationsrisiken (z. B. Blutverlust, Infektionen, Gefäß- oder Nervenverletzungen, Kompartmentsyndrom und bleibendem Funktionsverlust) korreliert

eine Vielzahl der Komplikationen direkt mit der Behandlungsdauer [Kneser 2006, Rüter 1995]. Nosokomiale Infektionen können zum Teil mit letalen Krankheitsverläufen einhergehen. Bei immobilisierten Patienten mit Frakturen der langen Röhrenknochen ist in 30-50% mit dem Auftreten einer proximalen tiefen Beinvenenthrombose zu rechnen. 5% dieser Patienten bildet eine klinisch relevante Lungenarterienembolie aus [Coventry 1973]. Bis zu 5% der Frakturen an der unteren Extremität heilen nur verzögert aus oder bilden sogar Pseudarthrosen [Littenberg 1998]. Ursache hierfür sind vor allem mechanische Faktoren, wie Fehlbelastung und ungenügende Stabilisierung, oder komplexe biologische Einflüsse, wie beispielsweise mangelnde Gefäßeinsprossung und Weichteilschäden, mit konsekutiv verzögerter Frakturheilung [Littenberg 1998]. Die heute zur Verfügung stehenden Techniken zur Augmentation der Knochenheilung wie Autograft, Segmenttransfer, Allograft, Knochenersatzstoffe, elektrische und sonographische Stimulation sind leider im Ergebnis oftmals unbefriedigend [Pelinkovic 2001]. Darüber hinaus kann die Kallusbildung durch die Einnahme von Medikamenten, wie z. B. Steroide, Zytostatika oder nichtsteroidale Antirheumatika beeinträchtigt werden [Pelinkovic 2001]. Im Zuge einer immer älter werdenden Bevölkerung gewinnen heutzutage infolge von Osteoporose entstehende Frakturen zunehmend an Bedeutung [Egermann 2005]. In Deutschland werden mehr als die Hälfte aller Frauen und 15% aller Männer älter als 65 Jahre eine osteoporotische Fraktur erleiden [[www.boneandjointdecade.de/html/fakten\\_fragen.html](http://www.boneandjointdecade.de/html/fakten_fragen.html), 2012]. Diese Frakturen heilen schlechter und stellen eine entscheidende Ursache für Morbidität sowie Mortalität bei älteren Menschen dar [Egermann 2006].

Es zeichnet sich ein rasanter Bevölkerungsanstieg ab, während 1950 ca. 2,5 Milliarden Menschen auf der Erde lebten, waren es 1998 bereits 5,9 Milliarden. Die Prognose für das Jahr 2050 beläuft sich auf 9 Milliarden Menschen. 1997 waren 380 Millionen Menschen über 65 Jahre alt, 2020 sollen es global 690 Millionen sein. In Studien wurde die Beziehung zwischen dem Alter der Bevölkerung und dem Risiko eine Fraktur zu erleiden untersucht. In der Altersgruppe 5-17 Jahre kommt es am häufigsten zu Frakturen an den Extremitäten, bei Menschen über 65 Jahre stehen Hüftfrakturen an erster Stelle. Angesichts der Tatsache, dass die Bevölkerungszahlen in den kommenden Jahren immer weiter zunehmen, steigen auch die auftretenden Frakturen weiter an [Knowledge Enterprises Inc. 2000].

### 3.3. Biologische Intervention zur Beeinflussung der Knochenheilung

Durch die Entwicklung und Verbesserung neuer sowie bestehender Implantatsysteme konnte aus biomechanischer Sicht die Behandlung von Frakturen in den letzten Jahrzehnten verbessert werden. Um weiterhin bestehende Behandlungsprobleme anzugehen, sollte sich das Hauptaugenmerk allerdings auf die Lösung der Probleme biologischer Natur richten.

Unter biologischen Verfahren bzw. Wirksubstanzen zur Stimulation der Frakturheilung versteht man z. B. autogene und allogene Knochentransplantate. Darüber hinaus gibt es lokale als auch systemische Faktoren mit osteoinduktiver Wirkung, die Zellmigration, -proliferation und -differenzierung stimulieren können. Die Weiterentwicklungen der verschiedenen Methoden bzw. Substanzen zur Stimulation der Frakturheilung erfolgen in unterschiedlichsten Richtungen. Der experimentelle Einsatz von Wachstumsfaktoren ist während des letzten Jahrzehnts ansteigend [Schilephake 2002]. Es konnten bereits in verschiedenen experimentellen Studien die positiven Effekte von Wachstumsfaktoren, sowohl bei systemischer als auch lokaler Applikation, auf die Frakturheilung nachgewiesen werden [Egermann 2006; Gautschi 2007; Raschke 2002; Schmidmaier 2001A; Schmidmaier 2002A]. Dabei kam es zu einer deutlichen Beschleunigung des Heilungsprozesses.

Für den Patienten würden der Einsatz von Wachstumsfaktoren und die damit verbundene Beschleunigung der Frakturheilung eine Verringerung der frakturbedingten Folgeoperationen bedeuten. Die verkürzte Behandlungsdauer würde zu einem schnelleren Wiedereinstieg in die Arbeitswelt führen, die Erwerbsminderung oder Frühberentung reduzieren und damit einen großen Gewinn an Lebensqualität darstellen. Die Kosten für Krankenhausaufenthalte, Nachbehandlung und Hilfsmittel könnten somit gemindert werden.

In den letzten Jahren haben Wachstumsfaktoren (WF) zunehmende Bedeutung in der traumatologischen und orthopädischen Forschung gewonnen.

Schon um 1920 vermutete Bier, dass die Frakturrenden des Knochens ein „Agens“ freisetzen, das den Heilungsprozess positiv beeinflusst [Bier 1918]. Von da an wurde die Suche nach dem „Wund-Hormon“, speziell im Frakturhämatom, fortgesetzt [Pritchard 1963; Urist 1952]. 1938 entdeckte Levander, dass die intramuskuläre Injektion eines in saurem Alkohol gelösten Knochen- und Kallus-Extrakts die Bildung ektopen Knochen- und Knorpelgewebes auslöst. Daraus schlussfolgerte er, dass die Knochenregeneration ein Resultat der Aktivierung undifferenzierten mesenchymalen Gewebes durch spezifische knochenbildende Substanzen sei [Levander 1938]. Im Jahr 1965 gelang es Urist *et al.* erneut mittels eines Extrakts aus

demineralisiertem Knochen ektope Knochensubstanz zu erzeugen [Urist 1965]. Es folgten zahlreiche Experimente zur Erforschung der lokalen Knochenstimulation durch extrazelluläre Matrix, in deren Verlauf einige Wachstumsfaktoren (WF), als erstes Bone morphogenetic protein (BMP), entdeckt wurden.

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die generalisiert, in sehr geringen Konzentrationen, in spezifischen Geweben gebildet werden und als lokale Faktoren der Zellregulation fungieren. Die meisten Wachstumsfaktoren werden als hochmolekulare Vorstufen freigesetzt, die durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt werden. Wachstumsfaktoren und Hormone sind wichtige Steuerelemente des Knochenmetabolismus [Lind 1998]. *In vitro*- und *in vivo*-Studien belegen zahlreiche regulierende Effekte osteoinduktiver WF und zeigen, dass einige dieser Faktoren die Knochenheilung stimulieren [Aspenberg 1992; Joyce 1990; Yasko 1992; Zheng 1992].

In der Tabelle 1 sind zusammenfassend die Stadien der Frakturheilung und die damit verbundene Expression von Signalmoleküle sowie deren Wirkweise dargestellt.

**Tab. 1 Zusammenfassung der verschiedenen Stadien der Frakturheilung und die damit einhergehenden Signalmoleküle [modifiziert nach Al-Aqi 2008]**

Heilungsphase	Biologische Prozesse	Expression der Signalmoleküle und deren Funktion
Inflammation	Hämatom	IL-1, IL-6, und TNF- $\alpha$ , Initiierung einer Heilungskaskade
	Inflammation	TGF- $\beta$ , PDGF, und BMP-2, Expression steigt an, Anregung der Kallusbildung
	Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen (MSC)	GDF-8 nur an Tag 1, Kontrolle der Zellproliferation
Chondrogenese und periostale Antwort	Beginn der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation	TGF- $\beta$ 2, - $\beta$ 3, und GDF-5, Beteiligung an Chondrogenese und endochondraler Knochenbildung
	Zellproliferation und intramembranöser Ossifikation	BMP-5 und -6, Konzentration steigt an
	Gefäßeinsprossung	Angiopoietin und VEGF stimulieren die Gefäßeinsprossung in das Periost.
	Neoangiogenese	
Knorpelresorption und primäre Knochenformation	Phase der aktivsten Osteogenese	TNF- $\alpha$ steigt in Verbindung mit der Resorption von mineralisiertem Knorpel. Das fördert die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und induziert Apoptose von hypertrophen Chondrozyten.
	Rekrutierung von Knochenzellen und Bildung von Geflechtknochen	RANKL und MCSF steigen in Verbindung mit Resorption von mineralisiertem Knorpel.
	Apoptose von Chondrozyten und Proteolyse von Matrix	
	Rekrutierung von Osteoklasten und Resorption von Knorpel	BMP-3, -4, -7, und -8 steigen in Verbindung mit der Resorption von kalzifiziertem Knorpel. Sie fördern die Rekrutierung von Osteoblasten.
	Neoangiogenese	BMP-5 und -6 weiterhin mit hoher Konzentration, regulatorischer Effekt in intramembranöser und Endochondraler Ossifikation. VEGF vermehrt gebildet zur Stimulation der Neoangiogenese.
Sekundäre Knochenformation und Remodeling	Knochen-Remodeling, Osteoblastenaktivierung	IL-1 und IL-6 steigen erneut in Verbindung mit Knochen-Remodeling, hingegen fallen die Konzentrationen von RANKL und MCSF.
	Bildung von Knochenmark	Abfallende Expression von Mitgliedern der TGF- $\beta$ Superfamilie.

An ihren Zielzellen vermitteln sie sowohl eigene Effekte, als auch die Wirkungen systemischer Hormone wie Vitamin D, Kalzitinin, Parathormon und Wachstumshormon (GH) [Canalis 1988, Raisz 1981]. Auf Mesenchymzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten üben Wachstumsfaktoren zahlreiche Effekte aus. Beispiele hierfür sind die Proliferation und Differenzierung von Mesenchymzellen, Chondrozyten und Osteoblasten sowie die Stimulation der Angiogenese. Des Weiteren induzieren sie die Expression von extrazellulärer Matrix [Al-Aql 2008, Sandberg 1993].

Nach Freisetzung aus der Knochenmatrix sind Wachstumsfaktoren in der Lage, den Metabolismus von Osteoblasten und -klasten während der Remodelingvorgänge zu steuern sowie die Heilungsantwort nach einem Trauma anzuregen und zu kontrollieren (Tab. 1) [Canalis 1988, Joyce 1990]. Es ist wahrscheinlich, dass die Konzentration der im Knochen gespeicherten Wachstumsfaktoren mit festlegt, in welchem Ausmaß Knochenneubildung und Resorption aneinander gekoppelt sind [Linkhart 1996].

Im Weiteren soll speziell auf die Eigenschaften und Wirkungen der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) eingegangen werden.

Es wurde in zahlreichen Studien belegt, dass diese Wachstumsfaktorengruppe über deutliche chondro- und osteoinduktive Eigenschaften verfügt [Barnes 1999, Cheng 2003, Cho 2002, Lieberman 2002].

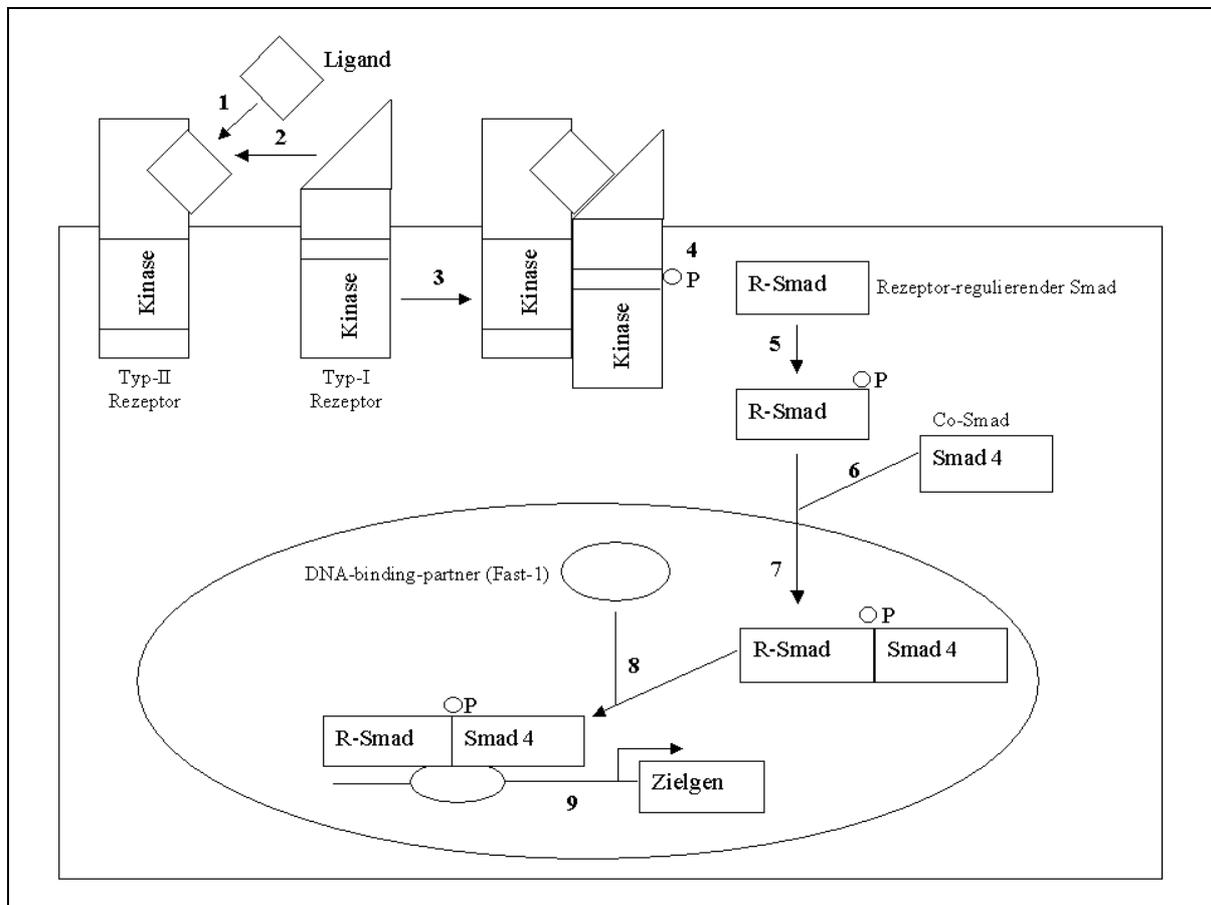
Nach der Entdeckung durch Urist im Jahre 1965, konnten 23 Jahre später die entsprechenden Proteine isoliert und geklont werden, die eine ektope Knochenbildung im Muskelgewebe hervorriefen [Urist 1965, Wozney 1988].

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gehören als multifunktionale Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) Superfamilie an. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden mehr als 30 Proteine identifiziert, die der BMP-Subfamilie zugeordnet werden können [Celeste 1990, Ducky 2000].

Diese lassen sich wiederum in verschiedene Untergruppen, abhängig von Struktur und Funktion, unterteilen. Die Knochen- und Knorpelinduktion *in vivo* wird durch BMP-2/4 als auch durch BMP-7 gefördert, während durch den Growth Differentiation Factor-5, -6 und -7 (GDF-5, -6 und -7) die Bildung von Knorpel und Sehnen stimuliert wird [Kawabata 1998].

BMPs binden hauptsächlich an Serin-/Threoninkinase Rezeptoren, die sich in Typ I und Typ II unterteilen lassen. Diese lassen sich wiederum in je 3 Subtypen einteilen, die in verschiedenen Geweben vorkommen. Sowohl Typ I als auch Typ II spielen in der intrazellulären Signaltransduktion eine essentielle Rolle. Die Signale werden über die Rezeptoren und

intrazelluläre Smad-Proteine vermittelt. Ein Komplex aus Smad 1, 4, 5 und 8 transloziert in den Zellkern und wirkt auf die Gentranskription (Abbildung 2).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der BMP-Signaltransduktion.**

Die Bindung von BMP-2 an seinen Typ-II-Rezeptor (1) führt zusammen mit dem Typ-I-Rezeptor (2) zu einem Rezeptorkomplex (3) und zu einer Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors (4). Nach dieser Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung eines Rezeptor-regulierenden-Smads (R-Smad) (5), der mit Smad 4 (6) gekoppelt zum Nucleus gelangt (7). Im Nucleus bindet dieser Smad-Protein-Komplex mit einem DNA-binding-partner (8). Dieser Komplex koppelt an das spezifische Enhancer-Ziel-Gen (9) und aktiviert die Transkription der Zielgene [Massagué 1998].

Die BMP-Signalübermittlung wird auf unterschiedlichen molekularen Ebenen reguliert (z. B. Inhibition durch Noggin und Chordin) [Chen 2004].

BMP-2 und BMP-7 (Osteogenic Protein-1, OP-1) besitzen eine deutliche osteoinduktive Wirkung und wurden von der Food and Drug Administration (FDA) für den klinischen Einsatz freigegeben [Bishop 2007, McKay 2007]. Vorklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass BMP-2 für verschiedene therapeutische Interventionen wie z. B. offene Tibiafrakturen und in der Wirbelsäulenchirurgie eingesetzt werden kann [Alt 2006, <http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recently-approveddevices/ucm081154.htm>].

Sowohl das in der Klinik eingesetzte BMP-2 (INFUSE® Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, U.S.A. und InductOs®, Wyeth, Münster, Deutschland) als auch BMP-7 (Osteogenic Protein-1, OP-1) (Osigraft®, Olympus Europa, Hamburg, Deutschland) sind rekombinant hergestellte humane Proteine. Der Nachteil dieser Proteine ist neben der kostenintensiven Herstellung die kurze Halbwertszeit. Des Weiteren werden relativ hohe Dosen benötigt um ein Knochenwachstum zu induzieren [Govender 2002]. Fraglich ist außerdem, ob eine einzelne Gabe von rekombinanten Proteinen ausreicht um suffizient osteoinduktiv zu wirken [Lieberman 2002]. Rekombinant hergestellte Proteine sind Fremdeiweiße und können als solche immunologische Antworten im Organismus auslösen.

2008 veröffentlichte die FDA lebensbedrohliche Komplikationen nach Wirbelsäulenoperationen in Zusammenhang mit dem Einsatz von rhBMP-2. Es zeigte sich eine höhere Rate an Nebenwirkungen für rhBMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beschriebene Nebeneffekte waren beispielsweise radiologisch sichtbare Osteolysen und Implantatzusammenfall. Außerdem wurden Harnverhalt, retrograde Ejakulation, frühe Wundinfektionen sowie Bein- und Rückenschmerzen beschrieben. Bei Operationen im Bereich der Halswirbelsäule kam es zu Schwellungen der Halsweichteile und damit verbundener Kompression von Nerven und Verlegung der Atemwege. Es waren öfter Intubationen, antiinflammatorische Maßnahmen, Tracheotomien sowie Zweiteingriffe im Bereich des Operationsgebietes notwendig [Carragee 2011].

Ähnliche Nebenwirkungen wurden für rhBMP-2 im Rahmen der Behandlungen außerhalb der Wirbelsäulenchirurgie nachgewiesen. Bis Ende 2011 hat die Food and Drug Administration (FDA) in 62 Fällen dazu Meldungen erhalten. Wundinfektionen, atypische Knochenbildung, Pseudarthrosen und lokale Entzündungsreaktionen gehörten zu den am häufigsten berichteten unerwünschten Ereignissen. In beinahe der Hälfte der Berichte (30 Berichte entsprechen 48%) wurde festgestellt, dass die Patienten Zweiteingriffe aufgrund der genannten Nebenerscheinungen benötigten. Die meisten Zwischenfälle (49 Fälle entsprechen 79%) ereigneten sich nach Behandlung im Off-Label Use z. B. Behandlung von Tibiaplateau-Frakturen, Behandlung von kongenitalen Tibiapseudarthrosen und Humerusrekonstruktionen [Woo 2013].

Eine Alternative zum rekombinanten BMP und dessen mögliche Nebenwirkungen stellt die Genterapie dar. Vorteile dieser Strategie sind zum einen die länger anhaltende Expression des gewünschten Proteins, ein Erreichen an hohen lokalen Konzentrationen der Wirksubstanz und die daraus resultierende größere Effektivität. Zum anderen wird das Risiko der systemischen

Nebenwirkungen, wie z. B. Immunantworten des Organismus auf die Wirksubstanz durch die lokale Gentherapie minimiert [Simpson 2006].

### **3.4. Gentherapie**

Unter der Gentherapie verstand man im ursprünglichen Sinn das Einbringen von intakten Genen in den Organismus bzw. in den Patienten um defekte Gene zu ersetzen bzw. zu komplementieren [Martin 1998]. Mittlerweile versteht man unter dem Begriff der Gentherapie das Einbringen genetischen Materials in die Zellen eines Individuums mit dem Ziel einen therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen zu erzielen [Health Department of the United Kingdom Gene Therapy Advisory Committee 2001].

Grundlage dieses Konzeptes ist die Erkenntnis, dass in den Genen der Bauplan für Proteine verschlüsselt ist. Somit führt ein in Zielzellen eingebrachtes therapeutisches Gen zur Produktion eines therapeutischen Agens, im Allgemeinen ein Protein. Die Besonderheit der Gentherapie im Vergleich zur „klassischen“ Therapie besteht darin, dass der Organismus ein körpereigenes Medikament produziert. Das ursprünglich verabreichte „Medikament“ ist jedoch genetisches Material, d. h. Nukleinsäuren (DNA, RNA) [Friedmann 1997].

Im Allgemeinen unterscheidet man die somatische Gentherapie von der Keimbahngentherapie [Dyer 2000]. Die somatische Gentherapie beschreibt die Behandlung bestimmter Zielzellen, die für die Entstehung oder die Therapie eines Krankheitsbildes relevant sind. Die Keimbahn ist von dieser Art von Therapie nicht betroffen. Die durch den Gentransfer veränderten genetischen Merkmale werden nicht vererbt. Anders dazu wird bei der Keimbahngentherapie ein Eingriff in das Erbgut beispielsweise einer befruchteten Eizelle oder einer anderen frühembryonalen Entwicklungsstufe vorgenommen. Eine solche Veränderung würde sich theoretisch auf alle Gewebe des Organismus auswirken und neue Eigenschaften würden an die Nachkommen weitergegeben werden. Diese Art der Gentherapie ist in der Bundesrepublik Deutschland verboten (Embryonenschutzgesetz von 1991) [Bundesministerium der Justiz, Embryonenschutzgesetz, §5].

Die Strategien der Gentherapie lassen sich in *ex vivo*- und *in vivo*-Therapiemodellen einteilen (Abb. 3).

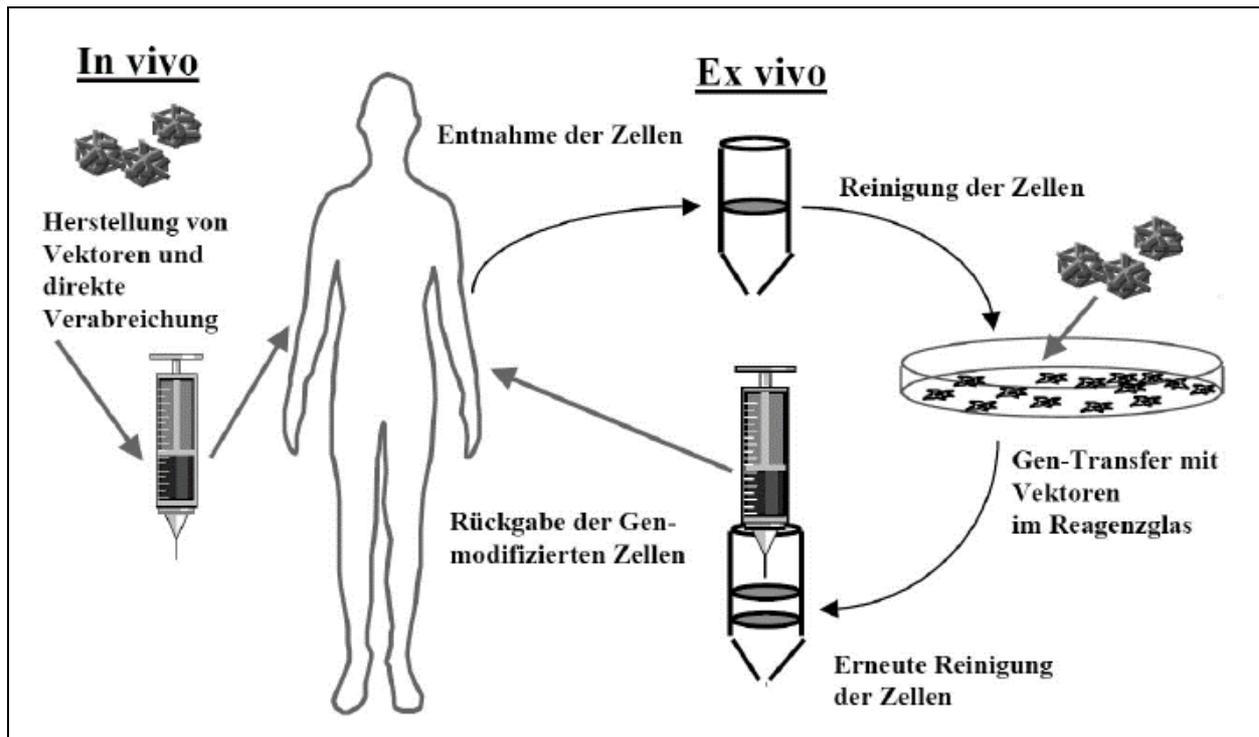


Abb. 3: Schematische Darstellung der Gentherapie-Prinzipien. [modifiziert nach Hallek *et al.* 1999]

Bei der *ex vivo*-Gentherapie werden im Gegensatz zur *in vivo*-Gentherapie (direktes Einbringen der Vektoren in den Zielorganismus bzw. in das Zielgewebe) die Zielzellen dem Organismus entnommen, mit dem therapeutischen Gen transfiziert und später wieder reimplantiert. Vorteil dieses relativ aufwendigen Verfahrens ist, dass die rekombinanten Zellen gut charakterisierbar sind und die transfizierten Zellen vor der Reimplantation selektiert und expandiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die Umgehung der bei der *in vivo*-Gentherapie auftretenden physiologischen Barrieren. Der große Vorteil der *in vivo*-Gentherapie besteht jedoch in der Einfachheit ihrer Durchführung.

#### *Extrazelluläre und intrazelluläre Barrieren:*

Bereits bei der Applikation wird die DNA bzw. der Genvektor sowohl mit Körperflüssigkeiten und deren Inhaltsstoffen, als auch mit mechanischen/anatomischen Barrieren konfrontiert [Pouton 1998].

Dazu zählen unter anderem Serumproteine, die beispielsweise durch Bindung an den Vektor deren physiko-chemische Eigenschaften verändern, so dass die DNA oder der Genvektor von Phagozyten abgebaut werden kann und wirkungslos wird. Durch Wechselwirkungen von Serumproteinen und Erythrozyten mit der DNA oder dem Vektor kann es außerdem zur

Aktivierung des Komplementsystems kommen. Serumprotease und -nukleasen vermindern weiter die biologische Aktivität durch Beseitigung aus dem Blutstrom [Dash 1999, Li 2001].

Bei viralen Vektoren zeigt sich häufig nach erneuter Applikation eine stärkere Immunreaktion mit Aktivierung des Komplementsystems als nach der ersten Verabreichung [Plank 1996]. Der Grund dafür ist die vorangegangene Antikörperbildung [Vandenberghe 2007]. Bei nicht-viralen Vektoren kann die überwiegend positiv geladene extrazelluläre Matrix dazu führen, dass die Ladung der Vektoren dissoziiert [Simberg 2003, Li 1999].

Trifft die DNA bzw. der Vektor auf die Zielzelle, stellt die Plasmamembran die erste intrazelluläre Barriere dar. Deren Überwindung geschieht in der Regel durch Endozytose oder Membranfusion [Wrobel 1995, Zabner 1995, Zhou 1994]. Die Geschwindigkeit dieser Vorgänge ist vom Zelltyp und von der Größe der Partikel abhängig [Zhou 1994]. Ist die DNA oder der Vektor in ein sogenanntes Endosom aufgenommen, kann dieses die anschließende Genexpression verhindern [Cotten 1992, Plank 1994]. Endosomen können aber auch mit Lysosomen fusionieren, was einen Abbau des Genvektors bzw. der DNA mittels lysosomaler Enzyme nach sich zieht [Lechardeur 2005, Zhou 1994]. Viren haben Mechanismen entwickelt, die eine Freisetzung ihres Genoms in das Zytoplasma bewirken. Solche Strategien versucht man bei einigen nicht-viralen Vektoren nachzuahmen. Im Zytoplasma selbst ist eine entsprechende Stabilität des Vektors notwendig, da die transportierte Nukleinsäure dem Angriff von Nukleasen ausgesetzt ist [Lechardeur 1999]. Die Transportvorgänge in den Zellkern sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der DNA-Transport zum Zellkern neben dem Zytosol auch vom Nuclear Pore Complex (NPC) reguliert wird [Lechardeur 1999].

Voraussetzung das genetische Material als Medikament zu nutzen, ist dieses in die Zielzellen durch Überwindung der beschriebenen Barrieren einzuschleusen. Dazu ist es notwendig effiziente Methoden zur Einschleusung zu entwickeln. Zu diesem Zweck werden sogenannte Genvektoren konstruiert. Unter Genvektor versteht man dabei ein Vehikel, das dazu dient ein therapeutisches Gen über die bestehenden Barrieren hinweg an die Zielzellen zu bringen, in diese einzuschleusen und möglicherweise den Transport in den Zellkern zu unterstützen [Finsinger 2000, Pouton 1998].

Ein „idealer“ Vektor sollte einerseits effektiv das Genmaterial einschleusen, eine hohe Selektivität für die angesteuerten Zellen und eine hohe Aufnahmekapazität von Genen haben. Andererseits sollte er eine ausreichend lange Expression der therapeutischen Gene erzielen. Vor allem aber ist es wichtig, eine ausreichende Sicherheit in der Handhabung und bezüglich der Pathogenität sowie Immunogenität zu gewährleisten [Somia 2000].

Einfachstes Beispiel eines Genvektors ist ein rekombinantes Plasmid, in dem neben dem Promotor und dem therapeutischen Gen u. a. auch Sequenzen zur gezielten Selektion (z. B. Antibiotikaresistenzgen) und Replikation des Plasmids in prokaryoten (oftmals *Escherichia coli*) Wirtszellen kloniert sind. Nach dem erfolgreichen Transfer des Plasmids kann die klonierte Nukleinsäure vervielfacht werden [Rüger 1997].

Die Tatsache, dass Viren im Laufe Jahrmillionen langer Evolution effiziente Mechanismen zur Überwindung extra- und intrazellulärer Barrieren des Gentransfers entwickelt haben, macht man sich dahingehend zunutze, dass das therapeutische Gen in ein virales Genom integriert wird und das Virus als Vektor fungiert (Tab. 2). Diesen Vorgang nennt man Transduktion.

**Tab. 2: Vergleich viraler Vektoren. [Bonadio 1998; Pelinkovic 2001]**

Vektor	Integration ins Wirtsgenom	Transduktions-Effizienz	Vorteile	Nachteile
Retroviren	Ja	Hoch	stabile Transduktion teilender Zellen; geringe Immunogenität	nur Infektion mitotischer Zellen möglich; Risiko der Mutagenese
Adenoviren	Nein	Hoch	Transduktion teilender/nicht teilender Zellen; große Verpackungskapazität	Transiente Expression; Starke Immunantwort
Adeno-assoziierte Viren	Ja	Hoch	stabile Transduktion teilender/nicht teilender Zellen; niedrige Immunogenität	Geringe Verpackungskapazität; Risiko d. Mutagenese
Herpes-Simplex-Viren	Nein	Niedrig	große Verpackungskapazität; Neotropismus; Transduktion teilender/nicht teilender Zellen	Zytotoxizität

Viren gehören zu den kleinsten biologischen Organisationsstrukturen, die genetisches Material enthalten. Jedoch sind sie nicht in der Lage, sich ohne Hilfe einer Zelle zu replizieren. In über 70% aller Gentherapiestudien wurden Viren benutzt. Neben häufig genutzten Retro- (28%) und

Adenoviren (26%) kommen auch Adeno-assoziierte Viren sowie Herpes-Viren (z. B. Herpes simplex) zum Einsatz [Edelstein 2004].

Trotz des großen Potenzials Viren als Genvehikel nutzen zu können, machen die genannten limitierenden Faktoren (z. B. Immunogenität, Kapazität, Transfektionseffizienz) die Suche nach möglichen Alternativen nötig. Dies führte zur Entwicklung nicht-viraler Genvektoren. Auch diese sollen dazu dienen, das genetische Material in die Zelle zu schleusen. Beim Einschleusen genetischen Materials mithilfe nicht-viraler Vektoren spricht man von Transfektion. Folgende Methoden des non-viralen Gentransfers lassen sich unterscheiden:

- *physikalisch*
- *chemisch*
- *Lipofektion*
- *Polyfektion.*

Physikalische Gentransfermethoden sind die Mikroinjektion [Capecchi 1980], die 2004 in 14% aller klinischen Studien eingesetzt wurde [Edelstein 2004], die Bioballistik oder die Elektroporation [Kishimoto 2002]. Ein weiteres Beispiel ist die Magnetofektion, bei der paramagnetische Partikel als „Drug Carrier“ fungieren. Durch Anlegen eines Magnetfeldes wird die Transfektionseffizienz positiv beeinflusst [Scherer 2002A]. Ein großer Nachteil ist der Abbau der DNA im Zellinneren durch Nukleasen, was die Effektivität des Gentransfers deutlich reduziert.

Weitere Möglichkeiten Gene zu transferieren bieten chemische Transfektionsmethoden. Diese zeigen, verglichen mit viralen Genvektoren, eine wesentliche niedrigere Effizienz, haben aber auch den entscheidenden Vorteil, dass sie nicht immunogen wirken und geringe Toxizitätsraten aufweisen sowie einfach und sicher in der Handhabung sind [Felgner 1997].

Die Lipofektion, bei der kationische Lipide genutzt werden, ist die am häufigsten verwendete nicht-virale Gentransfermethode in der Gentherapie [Edelstein 2004].

Neben den Liposomen können auch Polykationen als Vektoren dienen. Beispiele für diese nicht immunogenen Vektoren sind Polylysin und Polylysinderivate, Polyethylenimin (PEI), Polyamidoamin-Dendrimere oder synthetische polykationische Peptide.

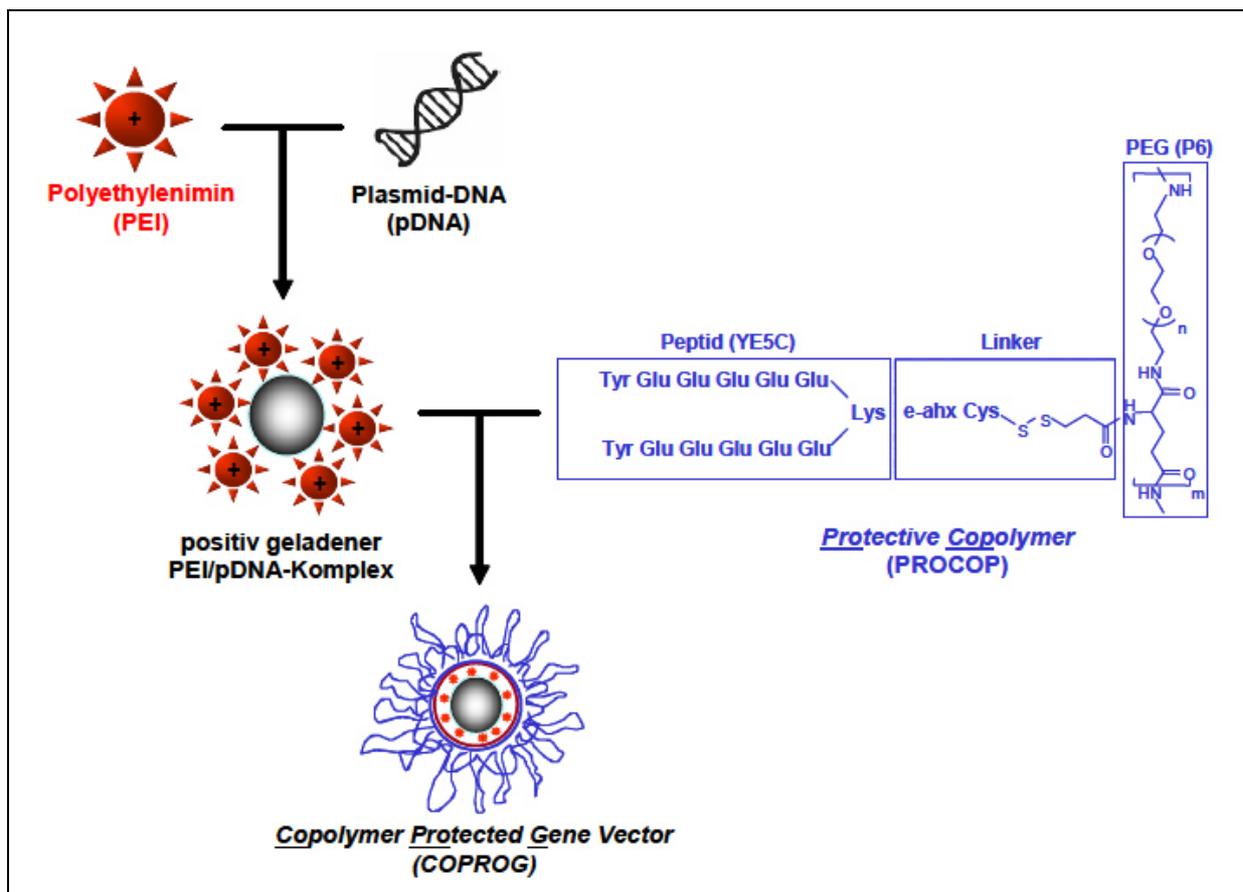
Das Prinzip beider zuletzt beschriebenen Methoden beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen kationischen Ladungen der Transporter (z. B. Dendrimere,

Nanopartikel, Polymere oder Lipide) und negativen Ladungen der DNA (Phosphatrückgrat), die dadurch Komplexe bilden [Felgner 1997].

Finsinger *et al.* synthetisierten protektive anionische Copolymere (PROCOPs) P6YE5C (bestehend aus Polyethylenglycol, (PEG) 6000), die mit der Plasmid-DNA eine Einheit bilden (siehe Abb. 4) [Finsinger 2000].

Es konnte gezeigt werden, dass diese PROCOPs die DNA vor Opsonierung und Komplementaktivierung schützen [Finsinger 2000].

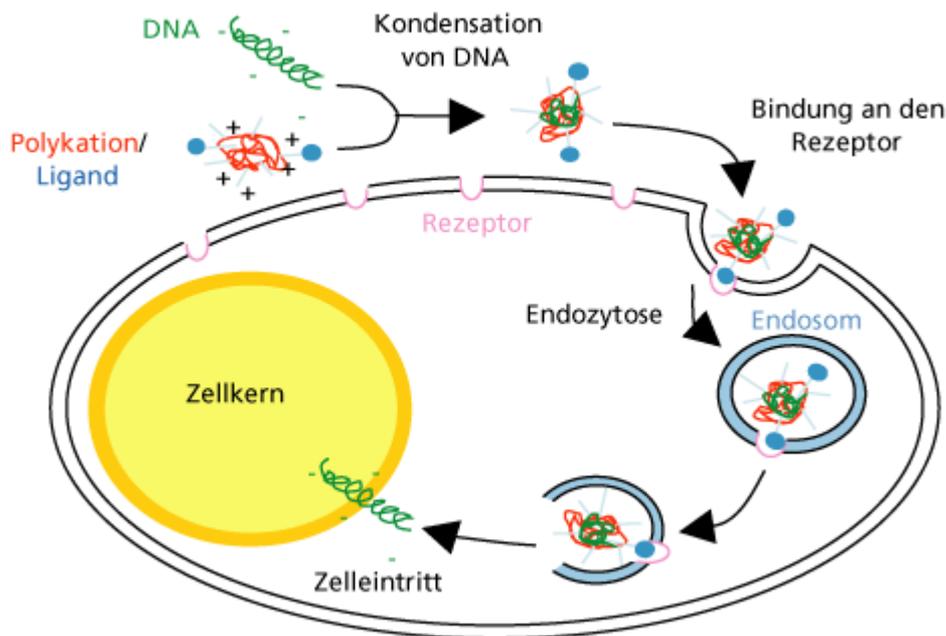
Zur Herstellung „Copolymer-protected gene vectors“ (COPROGs) wurde ein Polykation/cDNA-Komplex mit den PROCOPs inkubiert. Dabei lagern sich die protektiven Copolymere um den PEI (Polyethylenimin)/cDNA-Komplex [Finsinger 2000, Schillinger 2008]. Die entstandenen COPROGs (Abb. 4) schützen die DNA vor dem Abbau durch Nukleasen ohne dabei die Transfektionseffizienz zu beeinträchtigen. Sie sind in der Lage mit Rezeptoren und anderen Effektormolekülen zu reagieren [Finsinger 2000].



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines Copolymer-protected gene vectors.**

Bildung von „Copolymer Protected Gene Vectors“ (COPROGs) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen positiv geladenen PEI/pDNA-Komplexen und negativ geladenem „Protective Copolymer“ (PROCOP). [Finsinger 2000, Kullmer 2006]

Das spielt bei der Aufnahme in die Zellen eine wichtige Rolle. Die DNA, die durch die kationischen Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Polyplexe) kondensiert wurde, wird nach Bindung mit den Rezeptoren auf der Zelloberfläche über Endosomen aufgenommen. Intrazellulär rupturieren die Endosomen und die DNA wird nach intrazellulär freigesetzt (Abb. 5). Finsinger *et al.* konnten in einem Versuch zeigen, dass die Vektor-DNA *in vivo* durch PROCOPs vor Interaktionen mit dem Komplementsystem und vor Opsonierung geschützt ist [Finsinger 2000].



**Abb. 5: Zellulärer Mechanismus der DNA-Aufnahme.**

Die DNA wird zunächst durch kationische Lipide oder Polymere über elektrostatische Interaktion zu kleinen Komplexen (Lipoplexe bzw. Polyplexe) kondensiert, die nach Bindung mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche über Endosomen aufgenommen werden. Im nächsten Schritt werden die Lipo- bzw. Polyplexe aus den Endolysosomen freigesetzt und diffundieren zum Zellkern, in den sie aufgenommen werden. [Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung 2010 <http://www.nano-lifescience.de/forschung/genvektoren.html>]

### 3.5. Die biodegradierbare Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung

Neben der Wahl des Wachstumsfaktors und des Genvektors ist die Applikationsform der Wirksubstanz von entscheidender Bedeutung, sowohl in der unfallchirurgischen und in der orthopädischen Chirurgie als auch in vielen anderen Bereichen der Medizin. Vorangegangene Studien haben zur Entwicklung verschiedenster Applikationssysteme geführt. So können Wachstumsfaktoren systemisch durch Injektion verabreicht werden oder lokal via Pumpsysteme oder Kollagenschwämme [Musgrave 1999; Welch 1998]. Die lokale Applikation von BMP-2 aus Kollagenschwämmen wird bereits im klinischen Alltag angewandt [Haidar 2009]. Dabei handelt es sich jedoch zum Teil um bovines Material, das potenziell das Risiko der Krankheitsübertragung in sich birgt [Namikawa 2006]. Durch ungenaue Positionierung des „Carriers“ kann es zu unerwünschten Reaktionen wie z. B. ektopen Ossifikationen kommen.

Aufgrund kurzer Halbwertszeiten von Wachstumsfaktoren (Minuten bis Stunden) ist es wichtig, dass diese auf möglichst direktem Weg und kontinuierlich freigesetzt an den Wirkort gelangen können. Daher wird intensiv an neuen Applikationssystemen geforscht.

Eine derzeit interessante Stoffgruppe ist die der Polymere. Sie bieten eine Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten, wie z. B. bei Nahtmaterialien, Platten oder Schrauben. Dabei übernehmen die Polymere eine mechanische Funktion für einen bestimmten Zeitraum. Beim sogenannten „tissue engineering“ dienen sie als Leitstruktur für proliferierende Zellen bzw. neu entstehendes Gewebe. Eine weitere Möglichkeit die Polymere einzusetzen, besteht darin, dass verschiedene Wirksubstanzen wie beispielsweise Medikamente kontinuierlich aus einer Polymerbeschichtung freigesetzt werden [Göpferich 1998].

Für den klinischen Gebrauch ist neben der Biokompatibilität und Verträglichkeit der Polymere auch eine hohe mechanische Stabilität von großer Bedeutung. Die auf Laktidsäure und Glycolsäure basierenden biodegradierbaren Polymere scheinen diese Anforderungen zu erfüllen [Laurencin 1994, Schmidmaier 2001B].

Polylaktidsäure (PLA) ist ein durch Homopolymerisation von Laktidsäure-Molekülen hergestelltes Polymer. Folgende Polymere lassen sich von der Polylaktidsäure ableiten: Poly(L-Laktidsäure) (PLLA), Poly(D-Laktidsäure) (PDLA) und Poly(D,L-Laktidsäure) (PDLLA). In Abhängigkeit von der gewünschten Applikationsform können diese Homopolymere mit verschiedenen Molekulargewichten hergestellt werden. Für „Drug Delivery Systems“ sind z. B. Polymere mit einem Molekulargewicht von 2000 bis 120000 Dalton gut geeignet [Laurencin 1994].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Poly(D,L-Laktid) ist ein amorphes Homopolymer, das durch verschiedene Mechanismen wie z. B. Hitze, Oxidation und enzymatischen Abbau, hauptsächlich aber durch Hydrolyse zu Laktidsäure biodegradiert werden kann. Letztlich wird es als AcetylCoA in den Zitratzyklus eingeschleust, als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden. Nach der Metabolisierung können weder im Urin noch in Faeces toxische Metabolite des Laktids nachgewiesen werden. In einigen Versuchen wurde von milden, lokal begrenzten Entzündungsreaktionen berichtet, die jedoch transient waren [Kulkarni 1966, Majola 1991]. Generell besteht eine gute Verträglichkeit gegenüber dem PDLLA [Laurencin 1994].

In vorangegangenen Studien wurden in einem kalten Beschichtungsverfahren bioaktive Substanzen wie z. B. TGF- $\beta$ 1, IGF-1 und BMP-2 in die PDLLA-Beschichtung eingearbeitet [Schmidmaier 2001A; Schmidmaier 2002A und 2002B].

In Voruntersuchungen zeigte sich eine hohe mechanische Stabilität der 10  $\mu$ m dünnen PDLLA-Schicht auf Metalloberflächen [Schmidmaier 2001B]. In einer Studie wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren in stabiler Form in die Beschichtung eingearbeitet werden konnten und nach einer Lagerungszeit der beschichteten Implantate von 14 Monaten bei -20°C kein Aktivitätsverlust der Wachstumsfaktoren erkennbar war [Wildemann 2004]. In Elutionsversuchen kam es nach einem initialen Peak zu einer kontinuierlichen Freisetzung von Wachstumsfaktoren über 75% innerhalb von 42 Tagen. Des Weiteren wurde die Sterilität des Beschichtungsverfahrens sowie die Adhäsion von Mikroorganismen an die Beschichtungsoberfläche untersucht. Dabei zeigte sich eine reduzierte Keimbesiedlung der beschichteten Materialien [Schmidmaier 2001B].

PDLLA beschichtete Osteosynthesematerialien, z. B. intramedulläre Nägel sorgen für eine kontinuierliche Freisetzung von Wirksubstanzen, die in hoher Konzentration direkt an den Wirkort gelangen. Gleichzeitig wird die Fraktur stabilisiert und muss nicht eröffnet werden. Durch die Beschichtungsmöglichkeiten von verschiedenen Implantaten sind keine weiteren Applikationssysteme (z. B. Minipumpen, Katheter oder Injektionen) vor, während oder nach der Operation nötig. Das Risiko von Infektionen durch Katheter oder Injektionen und daraus möglicherweise resultierende Folgeeingriffe wird reduziert. Unerwünschte systemische Nebenwirkungen sind bei gleichzeitiger Steigerung der lokalen Effekte nicht zu erwarten [Schmidmaier 2001A und 2001B]. Durch die Freisetzung von rekombinantem BMP-2 aus der entwickelten biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung kann die Frakturheilung stimuliert werden. Dies konnte durch radiologische, biomechanische und histologische Untersuchungen im Rattenmodell bestätigt werden [Schmidmaier 2002; Wildemann 2011].

#### **4. Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Knochenheilung unter lokaler Applikation eines spezifischen Wachstumsfaktors (Bone Morphogenetic Protein-2) mit Hilfe eines neu entwickelten nicht-viralen Vektors (*Copolymer Protected Gene Vector*). Als Träger diente dabei ein Poly(D,L-Laktid)-beschichtetes Implantat. Der Einfluss der lokalen Gentherapie wurde am Frakturmodell der Ratte untersucht.

Es wurden histomorphologische und histomorphometrische Analysen sowie biomechanische Testungen (nicht Teil der vorliegenden Arbeit) durchgeführt. Der Heilungsverlauf wurde zusätzlich radiologisch kontrolliert.

Neben der Untersuchung des lokalen Effekts wurde auch die Sicherheit des gentherapeutischen Ansatzes durch Analyse einer möglichen Transfektion anderer Organe untersucht.

##### **4.1. Arbeitshypothese**

Die lokale Applikation von BMP-2 als Plasmid mit Hilfe eines neu entwickelten nicht-viralen Vektors aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Titandrähten stimuliert die Frakturheilung im Rattenmodell.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Weiterentwicklung biologischer Systeme dienen, die die Frakturheilung positiv beeinflussen.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Das Tiermodell

#### 5.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 145 weibliche Sprague Dawley Ratten (ca. 6 Monate alt, 250-300 g schwer). Diese Rasse wird speziell für die Forschung gezüchtet (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland).

Zur Eingewöhnung standen sie etwa 7 Tage in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité. Die Haltung der Ratten erfolgte bei einem künstlichen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und einer artgerechten Umgebungstemperatur von 22° Celsius in Typ 3 Käfigen zu je 5 Tieren. Futter (V-Alleinfutter für Ratten-/Mäuse-Haltung, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Die Durchführung der Versuche wurde vom Landesamt für Gesundheitsschutz, Arbeitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Nummer G 0088/03 genehmigt.

#### 5.1.2. Gruppeneinteilung und Versuchsplan

Die 145 Versuchstiere wurden für die Studie wie in Tabelle 3 gezeigt eingeteilt:

**Tab. 3: Gruppeneinteilung und Versuchsplan**

Gruppe	Methode	2d	4d	7d	28d	42d
Kontrollgruppe	Biomechanik				10	10
	Histomorphometrie				10	10
PDLLA + Copolymer	Biomechanik				10	10
	Histomorphometrie				10	10
PDLLA + COPROG + BMP-2 (40 µg)	Biomechanik				10	10
	Histomorphometrie				10	10
PDLLA + COPROG + Luc (40 µg)	Luciferase-Assay	5	5	5	5	5

## 5.2. Implantat und Beschichtung

Implantat:

- Titan-Kirschner-Draht (Synthes, USA)

Beschichtung:

- Trägermaterial - Poly(D,L-Laktid) Resomer 203 30kD (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- Vektoren - Copolymer Protected Gene Vector + BMP-2-Plasmid (40µg) (Prof. Dr. med. C. Plank; Institut f. Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland)

## 5.3. Operatives Vorgehen, Röntgen und Blutentnahme

### 5.3.1. Material

Operationsbesteck:

- Skalpell, Schere, Pinzette, Nadelhalter
- Prolene® Hautfaden 4/0 nichtresorbierbar (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland)
- Kirschnerdraht aus Stahl (Ø 0,8 und 1,0 mm) (Synthes, USA)

Narkose:

- Forene®, Inhalationsnarkotikum [Wirkstoff: 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether] (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Ketavet® 100 mg/ml, Injektionsnarkotikum [Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid] (Pharmacia Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Xylazin® 2%, Injektionsnarkotikum [Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid] (medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzzwickede, Deutschland)

Blutentnahme:

- Hämatokrit-Glaskapillaren, Blutbildröhrchen, Serumröhrchen
- Eppendorfcaps 1,5 ml, Spritzen, Kanülen, Pipetten
- Liquemin® N 25000 I.E., 5 ml [Wirkstoff: Heparin-Natrium] (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Röntgen:

- Digitalkassetten (Fuji Photo Film Co., Ltd. Japan)
- Filme (Fuji Photo Film Co., Ltd. Japan)

Sonstiges:

- OP-Tuch, steril und unsteril, Verbandsmaterial
- Softasept N®, Desinfektionsspray [Wirkstoff: 100% Ethanol] (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9%, 50 ml (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland)
- Kaliumchlorid 7,25%
- Pilca® Enthaarungscreme [Wirkstoff: Thioglykolsäure] (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Panthenol-Augensalbe [Wirkstoff: Dexpanthenol] (Jenapharm, Bibrach/Riss, Deutschland)

### 5.3.2. Geräte

- Anästhesie-GME 4 Narkosegerät (Stephan GmbH Medizintechnik, Gackebach, Deutschland)
- Digitalthermometer (Paul Hartmann AG, Heidelberg, Deutschland)
- Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Mobilett Plus-Röntgengerät (Siemens AG, München, Deutschland)
- EPPENDORF® Zentrifuge 5414 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln-Berlin, Deutschland)

## 5.4. Anästhesie und Operation

Die Versuchstiere wurden vor der Operation und den Kontrolluntersuchungen per inhalationem mit einem Gasgemisch bestehend aus Sauerstoff (1,5 l/min), Lachgas (3 l/min) und Isofluran (3-5 Vol. %) sediert.

Dazu wurden die Tiere in eine spezielle Narkosebox aus Plastik gesetzt. Die Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose während der Untersuchungen und des Röntgens erfolgte über eine Maske. Als intraoperatives Narkoseverfahren wurde die intraperitoneale Injektionsnarkose gewählt. Es wurde ein Gemisch aus Ketaminhydrochlorid (60 mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (4 mg/kg KG) nach Empfehlung des Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare von Sarah Wolfensohn, University of Oxford in einem Verhältnis von 1:0,75 I.E. appliziert. Durch die Intraperitonealanästhesie waren die Tiere während der 20 minütigen Operation analgosediert. Für die Zwischenuntersuchungen und das Röntgen erfolgte die Sedierung durch die oben beschriebene Inhalationsnarkose.

Unter Sedierung wurden die Ratten gewogen und dann weiter mit einer Inhalationsmaske in Narkose gehalten. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen. Anschließend wurde vom retrobulbären Venenplexus mit Hilfe von Haematokrit-Kapillaren circa 1 ml Blut entnommen

(Methode nach Nöller). Es wurden verschiedene Serumparameter untersucht (*siehe Abschnitt 5.6.*). Zur Unterscheidung der Tiere erfolgte eine Markierung mittels Edding am Schwanz.

Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit einer fettenden Augensalbe (Panthenol-Augensalbe®) benetzt. Der gesamte rechte Unterschenkel wurde mit einem elektrischen Rasierer enthaart. Zur Minimierung des Infektionsrisikos wurde die Extremität zusätzlich mit einer Enthaarungscreme (Pilca®-Enthaarungscreme) eingerieben und die restlichen Haare nach kurzer Einwirkzeit entfernt.

Das Operationsfeld wurde mit Ethanol (100 %) desinfiziert und steril abgedeckt, sodass der Eingriff unter aseptischen Bedingungen stattfand. Am proximalen Unterschenkel wurde an der ventralen Seite mit dem Skalpell eine ca. 5 mm große Hautinzision in Längsrichtung gesetzt (Abb. 6a). Im Anschluss wurde die Tibiamarkhöhle unter Bildverstärkerkontrolle medio-anterior mit einem Titan-Kirschner-Draht aus Stahl ( $\varnothing$  0,8 mm) eröffnet (Abb. 6b). Nach Entfernung des Drahtes wurde der rechte Hinterlauf in die speziell entwickelte Frakturmaschine eingespannt. Es wurde eine geschlossene Fraktur von Tibia und Fibula gesetzt (Abb. 6c). Anschließend wurden die Frakturrenden reponiert und die Tibia mit einem 1,0 mm starken beschichteten vs. unbeschichteten Titan-Kirschner-Draht stabilisiert (Abb. 6d). Das distale Drahtende wurde so dicht wie möglich an den Kondylen mit einer Kneifzange abgetrennt. Die Hautinzision wurde mit Hautfäden in Einzelknopfnah-Technik verschlossen. Danach wurde die Wundfläche desinfiziert und mit Sprühpflaster (Ankerplast®) sowie einem zusätzlich radiär verlaufendem Leukoplast®-Verband versorgt. Postoperativ wurde das operierte Bein aus einem Abstand von 60 cm, mit einer Röhrenspannung von 52 kV und einer Belichtungszeit von 1,8 mAs in zwei Ebenen geröntgt.

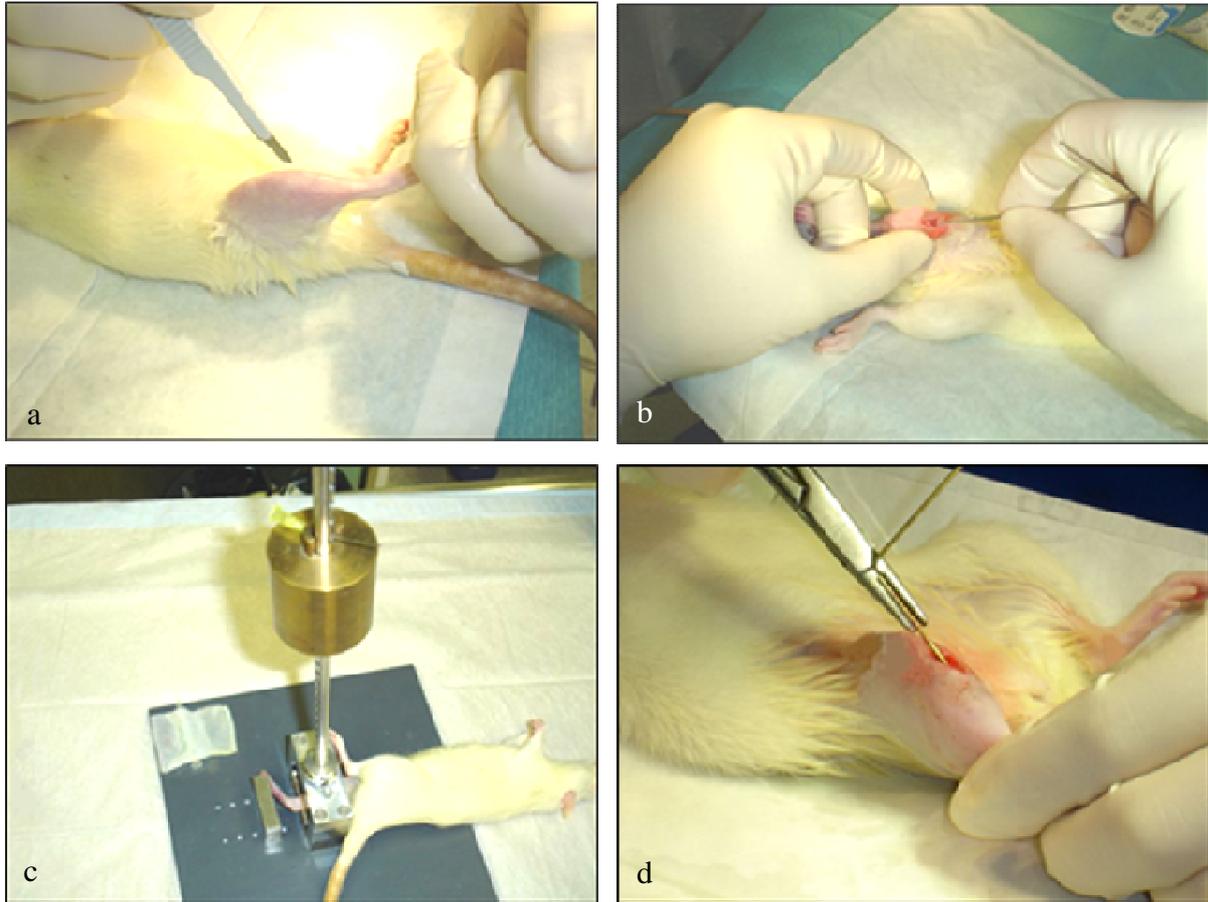


Abb. 6: Darstellung der Operationschritte. a) Hautinzision, b) Markraumeröffnung, c) Frakturierung und d) Stabilisierung.

### 5.5. Nachsorge und Untersuchungen

Alle Tiere wurden in hygienischer Umgebung auf täglich gewechselter Sägespaneinstreu gehalten. Der postoperative Verlauf wurde täglich kontrolliert. Neben der Inspektion der lokalen Wunde wurde auch auf Aussehen, Verhalten und Aktivität der Tiere geachtet.

Die Ratten wurden im Verlauf untersucht. Dabei erfolgten Kontrolluntersuchungen am Operationstag, 7, 14, 28 und 42 Tage postoperativ. Neben Blutentnahmen und der Anfertigung von Röntgenaufnahmen (am 28. und 42. postoperativen Tag) wurden Gewicht und Körpertemperatur bestimmt. Für die Untersuchungen wurden die Tiere mit einer Inhalationsnarkose (*siehe 5.4.*) sediert. Am zweiten Untersuchungstermin (14. postoperativer Tag) wurden der Verband und die Fäden entfernt.

## 5.6. Bestimmung der Serumparameter

Präoperativ bzw. an den Untersuchungstagen wurde vom retrobulbären Venenplexus mit Hilfe von Haematokrit-Kapillaren circa 1 ml Blut entnommen. Dieses wurde im *Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie* der *Charité-Universitätsmedizin Berlin* auf folgende Parameter hin untersucht:

Elektrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), kleines Blutbild, Glucose, Alkalische Phosphatase (AP) und C-reaktives Protein (CRP).

## 5.7. Radiologie

Ergänzend zur Gewichts- und Temperaturbestimmung erfolgten zur Kontrolle der Implantatlage sowie zur Beurteilung des Heilungsverlaufs der Fraktur radiologische Verlaufsuntersuchungen sowohl am Operationstag als auch an Tag 28 und 42 bzw. am Tag der Tötung. Für die radiologischen Untersuchungen wurden die Tiere sediert. Es wurden digitale Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen (posterior-anterior und lateral) mit einer Belichtungszeit von 1,8 mAs und einer Strahlenhärte von 52 kV angefertigt. Das Röntgengerät befand sich 60 cm über der Röntgenplatte. Die Entwicklung der Röntgenbilder erfolgte in der *Klinik für Strahlenheilkunde* der *Charité-Universitätsmedizin Berlin*. Die Beurteilung der Konsolidierung der Fraktur erfolgte am 28. und 42. postoperativen Tag. Die angefertigten Röntgenbilder wurden durch 2 unabhängige Personen mit dem 4-Cortices-Score ausgewertet:

- A: komplette Überbrückung (4 Cortices überbrückt)**
- B: inkomplette Überbrückung (1-3 Cortices überbrückt)**
- C: keine Überbrückung**

Anschließend wurden die Ergebnisse untereinander verglichen.

## 5.8. Tötung und Knochenentnahme für die Histologie

Die Tötung der Tiere erfolgte gemäß der Gruppeneinteilung am 28. bzw. 42. postoperativen Tag. Zunächst wurden die Ratten mittels Inhalationsnarkose (*siehe 5.4.*) sediert und untersucht.

Anschließend wurde den Ratten unter Narkose eine 7,25%ige Kaliumchloridlösung intrakardial injiziert, woraufhin in kürzester Zeit der Tod eintrat. Es erfolgte die Abschlussröntgenkontrolle in zwei Ebenen (p.-a. und lateral).

Die Freipräparation der Unterschenkelknochen erfolgte über einen Zugang im Bereich des proximalen Unterschenkels. Nach Exartikulation im Knie- und Sprunggelenk wurden Tibia und Fibula entfernt. Unter Schonung der Periosts und des Knochengewebes wurden Muskeln, Sehnen und Bänder vorsichtig abgelöst. Des Weiteren wurde die Fibula von der Tibia abgelöst und verworfen. Die bei der Operation implantierten Nägel wurden mithilfe eines Nadelhalters vorsichtig entfernt. Abschließend wurden die Kondylen als auch das distale Tibiaende mit einem Seitenschneider entfernt. Die Präparate wurden einzeln in nummerierten Plastikkassetten aufbewahrt und umgehend in Fixierlösung gelagert.

## 5.9. Histologische Untersuchung

### 5.9.1. Knochenaufbereitung (*Fixation, Entwässerung, Entfettung, Infiltration, Einbettung*)

#### Material

- Plastikkassetten Tissue Tek, Mega Cassette (Satura, USA)
- Fixierlösung:
  - 324 ml Formaldehyd 37%
  - 550 ml Alkohol 100%
  - 130 ml Barbital-Na-Puffer (0,1 molar, pH 7,3)
  - 6 g Glukose
- Schüttler, HS 501 digital (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)
- 70%, 80%, 96%, 100%iger Ethanol
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Polymethylmethacrylat Technovit® 9100 NEU (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG Kulzer, Wehrheim, Deutschland)
- Einbettformen aus Teflon mit Deckel (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG Kulzer, Wehrheim, Deutschland)

#### Durchführung

Der erste Schritt der Knochenaufarbeitung war die Fixierung. Dabei wurden komplexe intra- und supravitale Stoffwechselprozesse unterbrochen und postmortale Zerfallserscheinungen verhindert. Unmittelbar nach der Explantation wurden die in der Plastikkassette platzierten Knochen 3 Tage bei Raumtemperatur in einer formaldehydhaltigen Fixierlösung aufbewahrt. Während des Fixiervorganges befanden sich vier dieser Kassetten in verschließbaren Gläsern auf einem Schüttler.

Nach Ende der Fixationsdauer wurden die Präparate etwa 10 min. unter fließendem Leitungswasser gespült, um letzte Formaldehydreste zu entfernen. Anschließend erfolgte die Entwässerung gemäß dem Schema in Tabelle 4. Um Schrumpfungen und Zerreißen der Präparate zu vermeiden, erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

**Tab. 4: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Präparate.**

<b>Alkoholreihe (Ethanol)</b>	<b>Zeitdauer</b>
70%	3 Tage
80%	3 Tage
96%	3 Tage
96%	3 Tage
100%	3 Tage
100%	3 Tage
100%	7 Tage

Im Anschluss an die Entwässerungsreihe erfolgte die eintägige Entfettung der Präparate in Xylol bei Raumtemperatur. Das Xylol diente dabei als Intermedium zwischen dem Prozess der Entwässerung und der Infiltration.

Technovit® 9100 NEU ist ein Polymerisationsgemisch auf der Basis von Methylmethacrylat und ist speziell zur Einbettung von mineralisierten Geweben geeignet. Präinfiltrations-, Infiltrations- sowie Stammlösung A und B wurden gemäß dem nachfolgenden Schema hergestellt (Tab. 5). Die Lösungen lassen sich für etwa eine Woche bei einer Temperatur von 4°C lagern, wobei die Basislösung sowie die Stammlösungen A und B in verschließbaren Braunglasflaschen aufbewahrt werden sollten.

**Tab. 5: Verabreichungsschema des Polymerisationssystems Technovit® 9100 NEU.**

	<b>Basislösung</b>	<b>PMMA-Pulver</b>	<b>Härter 1</b>	<b>Härter2</b>	<b>Regler</b>
Material-Nr.	1	2	3	4	5
Präinfiltration	200 ml 190 g		1 g		
Infiltration	ad 250 ml 237,5 g	20 g	1 g		
Stammlösung A	ad 500 ml 475 g	80 g	3 g		
Stammlösung B	ad 50 ml 47,5 g			4 ml 4,3 g	2 ml 1,7 g
Polymerisations- Gemisch	9 Volumenanteile Stammlösung A + 1 Volumenanteil Stammlösung B				

Zunächst wurde die Basislösung mittels einer Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Chromatographiesäule entstabilisiert. Der Entfettung schloss sich eine zweitägige Präinfiltration und eine fünftägige Infiltration der Präparate in Technovit® 9100 NEU an.

Für das Polymerisationsgemisch wurden die Stammlösungen A und B gemäß dem Schema hergestellt und unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9:1 gemischt. Die Einbettformen, die die nummerierten Präparate beinhalteten, wurden randvoll gefüllt, mit einem Deckel fest verschlossen und für etwa 24 Stunden in einer Styroporbox auf Eis gelagert. Nach der Auspolymerisierung des Kunststoffes wurden die Proben aus den Teflonformen entnommen. Anschließend wurden die Präparate geschnitten.

### ***5.9.2. Herstellung der histologischen Schnitte***

#### Material

- Handschleifgerät Phoenix 3000 (Jean Wirtz, Bestellung über Metec, Laborgeräte Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Mikrotom SM 2500S (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Schneidmesser, Hartmetall, Schliff 16 cm (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Presse (Eigenentwurf), kleine Wasserwaage (BMI Messzeuge, Hersbruck, Deutschland)
- Wärmeschrank – Function line (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)
- Objektträger von Superfrost, 76 x 26 mm (Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

- Schleifscheiben Discs (WS-Flex 18-C SK, Hermes, Bestellung über dia-plus®, Walter Messner GmbH, Oststeinbek/Hamburg, Deutschland)
- Schneidflüssigkeit (Fa. WIV, Schwetzingen, Deutschland)
- Streckflüssigkeit: 30 ml Butoxyethyl-Acetat + 70 ml Alkohol 70%
- Kisol-Folie: 0,025 x 95 x 95 mm, farblos (Medim, Histotechnologie GmbH, Gießen, Deutschland)
- Filterpapier (58 x 58 cm); Pinsel fein; Pinzette fein

### Durchführung

Zur Anfertigung der histologischen Schnittpräparate in der Sagittalebene mit einer Dicke von 5 µm wurde ein Mikrotom verwendet. Zum Schneiden wurden Messer und Präparat eingespannt und gegeneinander bewegt. Der Block wurde so eingespannt, dass er waagrecht zum Messer lag. Das Messer wurde mit einem Freiwinkel von 5 - 6° eingestellt. Das Mikrotom wurde in eine Position gebracht, dass zwischen Messer und Block ein kleines Lichtfenster bestehen blieb. Der Hubvorschub wurde auf 60 µm eingestellt. Während des Schneidevorgangs wurde sowohl der Block als auch das Messer permanent mit Schneidflüssigkeit benetzt. Nachdem die gewünschte Ebene erreicht worden ist, wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe einer feinen Pinzette vorsichtig vom Messer abgenommen und auf vorbereitete, mit 70%igem Alkohol benetzte Objektträger, gelegt. Die Schnittpräparate wurden mit einer Streckflüssigkeit überschichtet und mit feinen Pinseln auseinander gezogen, so dass keine Falten zu sehen waren. Über das jeweilige gestreckte Präparat wurde eine Kisolfolie gelegt und der überschüssige Alkohol mit Filterpapier abgesaugt. Um eine vollständige Haftung der Schnitte am Objektträger zu gewährleisten, wurden die Schnitte bei 37°C für 2 Tage gepresst.

### **5.9.3. Färben der histologischen Schnitte**

#### Material

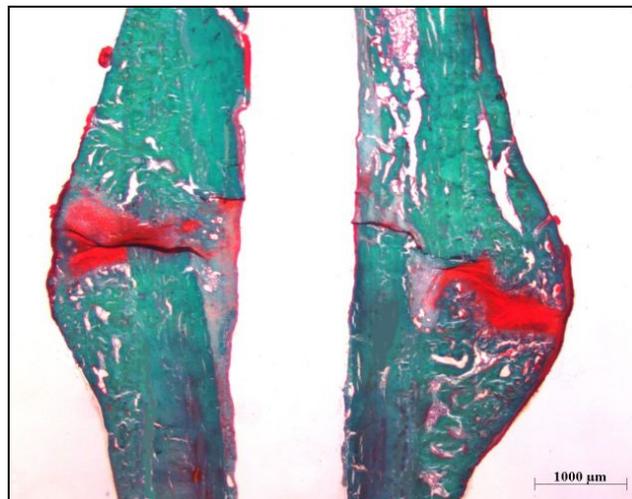
- (2-Methoxyethyl)-acetat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland)
- 100%iger Alkohol (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, Deutschland)
- [96% - 80% - 70% - 40%iger Alkohol werden mit Aqua dest. entsprechend verdünnt]
- Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- 1%ige Essigsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Lichtgrün (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Köngen, Deutschland)
- 1%ige Safranin O, Certistain® (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Pikrinsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 3%ige wässrige Silbernitratlösung (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumkarbonat-Formaldehydlösung mind. 37% (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- 5% Natriumthiosulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Vitro Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Als histologische Färbung bezeichnet man den Vorgang der Schnitffärbung, bei der ein in Lösung angebotener Farbstoff an definierte Gewebestrukturen bindet. Neben Schnittdicke beeinflussen auch die Färbetemperatur und die Farbstoffkonzentration den Ablauf der Färbungen sowie die Färbezeit.

Die histologischen Schnitte dieser Arbeit wurden mit Safranin O / Lichtgrün und nach von Kossa angefärbt.

### **Safranin O / Lichtgrün:**

Die Safranin O / Lichtgrün-Färbung eignet sich zur Darstellung von Knorpelgewebe. Dabei färbt sich das Knorpelgewebe rot und Knochen sowie Bindegewebe grün an (Abb. 7). Nach Entfernung der Kisolfolie von den Objektträgern erfolgte ein 3 x 30 minütiges Entplasten in (2-Methoxyethyl)-acetat [MEA]. Danach wurden die Schnitte in 100 - 96 - 80 - 70 - 40%igem Alkohol und Aqua dest. rehydriert. Dieser Vorgang war in beiden hier aufgeführten Färbemethoden gleich und nachfolgend nicht erneut beschrieben. Nach 8 - 10 minütigem Färben in Safranin O, gefolgt von einem kurzen Spülen in Aqua dest., verblieben die Präparate 10 Minuten in einem Pikrinsäurebad. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. und 1%iger Essigsäure gespült. Die Färbung in Lichtgrün dauerte 8 - 10 Minuten. Kurze Spülvorgänge in 1%iger Essigsäure, 100%igem Alkohol und 10 Minuten in Xylol schlossen sich an.



**Abb. 7: Histologische Färbung Safranin O/Lichtgrün.**

Knorpelgewebe stellt sich rot dar, Knochen und Bindegewebe sind grün angefärbt.

**Versilberung nach von Kossa:**

Die Versilberung nach von Kossa dient der Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe sowie den Mineralisationsfronten (Abb. 8). Das Entplasten der Schnitte glich dem der oben beschriebenen Safranin O/Lichtgrün-Färbung. Darauf folgte das Färben für 5 Minuten in 3%iger wässriger Silbernitratlösung, 3 maliges Spülen in Aqua dest. und eine zweiminütige Reduktion in Natrium-Formaldehydlösung. Nach 10 Minuten Wässern mit Leitungswasser verblieben die Schnitte für 5 Minuten in 5%igem Natriumthiosulfat und anschließend weitere 10 Minuten im Leitungswasser. Nach 5 Minuten in 5%igem Natriumthiosulfat folgte ein weiteres 10 minütiges Wässern in Leitungswasser. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte 70 - 80 - 96 – 100%igem Alkohol entwässert und 10 Minuten in Xylol gebadet. Jeder Färbeablauf endete mit dem Eindecken in Vitro Clud.



**Abb. 8: Histologische Färbung nach von Kossa.**

Mineralisierter Knochen und Mineralisationsfronten sind schwarz angefärbt, Knorpel und andere Gewebe stellen sich braun dar.

#### ***5.9.4. Digitalisierung und Auswertung mittels Bildanalyse***

##### Material

- Mikroskop: Leica DM R (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Objektiv: Vergrößerung 1,6 fach
- Kamera: AxioCam MRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Bildanalyzesystem Zeiss KS 400 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland)

### Durchführung

Das Bildanalyse-System besteht aus einem Lichtmikroskop mit Kamera und Anschluss an ein Datenverarbeitungsprogramm. Mit Hilfe eines speziell entwickelten Makros für das Bildanalyseprogramm KS400 wurden die gefärbten Schnitte histomorphometrisch ausgewertet. Dabei wurde die gewebetypische Färbung (z. B. schwarz für Knochen in der von Kossa-Färbung) erkannt und die Gesamtfläche des Gewebes berechnet. Der distale und der proximale Anteil des Frakturspaltes wurden auf folgende Parameter untersucht:

- Tibiadurchmesser (Baseline)
- Gesamtkallus, Kortikalis, periostaler und endostaler Kallus: Fläche, Knochen und das Verhältnis Knochen/Fläche

Für die knorpeligen Anteile erfolgte die Bestimmung der folgenden Parameter mit Hilfe der Safranin O / Lichtgrün-Färbung:

- Gesamtkallus, periostaler und endostaler Kallus: Fläche, Knorpel und das Verhältnis Knorpel/Fläche

Für die Auswertung wurden aus diesen Parametern folgende Werte in Anlehnung an Parfitt (1987) ermittelt:

- Baseline in mm
- Mineralisierter Knochenanteil der Kortikalis (Mineralized Area/ Cortec Area in %)
- Ausdehnung des periostalen Kallus (Periosteal Callus Area/ Baseline in mm)
- Mineralisierte Anteile periostal (Mineralized Area/ Periosteal Callus Area in %)
- Knorpelige Anteile (Cartilage Area/ Total Callus Area in %)

Im Folgenden werden an der Versilberung nach von Kossa die einzelnen Arbeitsschritte an der Bildanalyse dargestellt.

Vor jedem Messvorgang wurde mit einem speziellen Objektträger kalibriert, um die Messwerte vergleichen und in Beziehung setzen zu können. (Objektiv: 1,6 fach und Zoomfaktor: 0,5)

Die histomorphometrischen Parameter wurden in zwei Schritten proximal und distal des Frakturspaltes innerhalb einer „Region of Interest“ (ROI) gemessen. Die Ausdehnung der ROI nach proximal und distal definierte sich als die 1,5 fache Länge der sog. „Baseline“ und umfasste in der Breite den gesamten Kallusausschnitt.

Nach Positionierung des Objektträgers unter dem Mikroskop erschien ein Ausschnitt des Präparates auf dem Bildschirm (Abb. 9). Als nächstes wurden die Flächen des periostalen Kallus, der Kortikalis und des endostalen Kallus gemessen. Zu diesem Zweck wurde zunächst der periostale Kallus mit Hilfe einer „Image-Edit-Tool-Box“ (Polygon, Linienstärke 2, blau) markiert (Abb. 10).

Analog wurden die Flächen für die Kortikalis und endostalen Kallus markiert.

Im Anschluss wurde die Baseline markiert. Diese definiert sich von der Außenseite der ventralen Kortikalis zur Außenseite der dorsalen Kortikalis (blaue Linie) (Abb. 11). Zur Bestimmung des mineralisierten Kallusanteils wurden anhand der Versilberung nach von Kossa die knöchernen Anteile markiert und die mineralisierten Anteile in den einzelnen Kallusbereichen durch das Bildanalysesystem innerhalb der ROI berechnet.

Nach Ausmessen des proximalen Tibiaanteils wurde der distale in gleicher Weise bearbeitet.

Um die Knorpelfläche zu bestimmen, wurden in der Safranin O/Lichtgrün-Färbung die knorpeligen Anteile (rot angefärbt) markiert und die Knorpelanteile in den einzelnen Kallusbereichen ebenfalls durch das Bildanalysesystem innerhalb der ROI berechnet (Abb. 12). Zu einer genauen Beurteilung der Strukturen und Gewebe konnten die Bilder in einem größeren Zoomfaktor betrachtet werden. Außerdem wurde parallel zur Auswertung am Monitor das Präparat unter dem Mikroskop beurteilt.

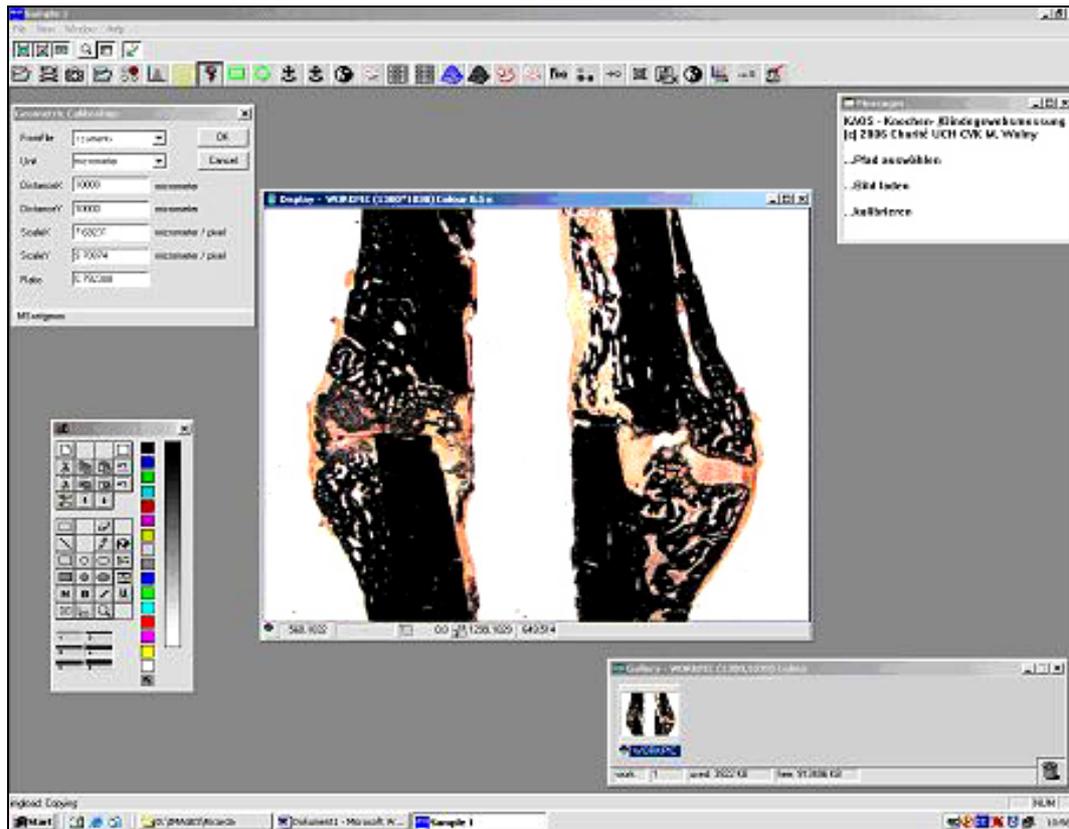


Abb. 9: Ausschnitt aus dem Bildanalyseprogramm Zeiss KS 400.

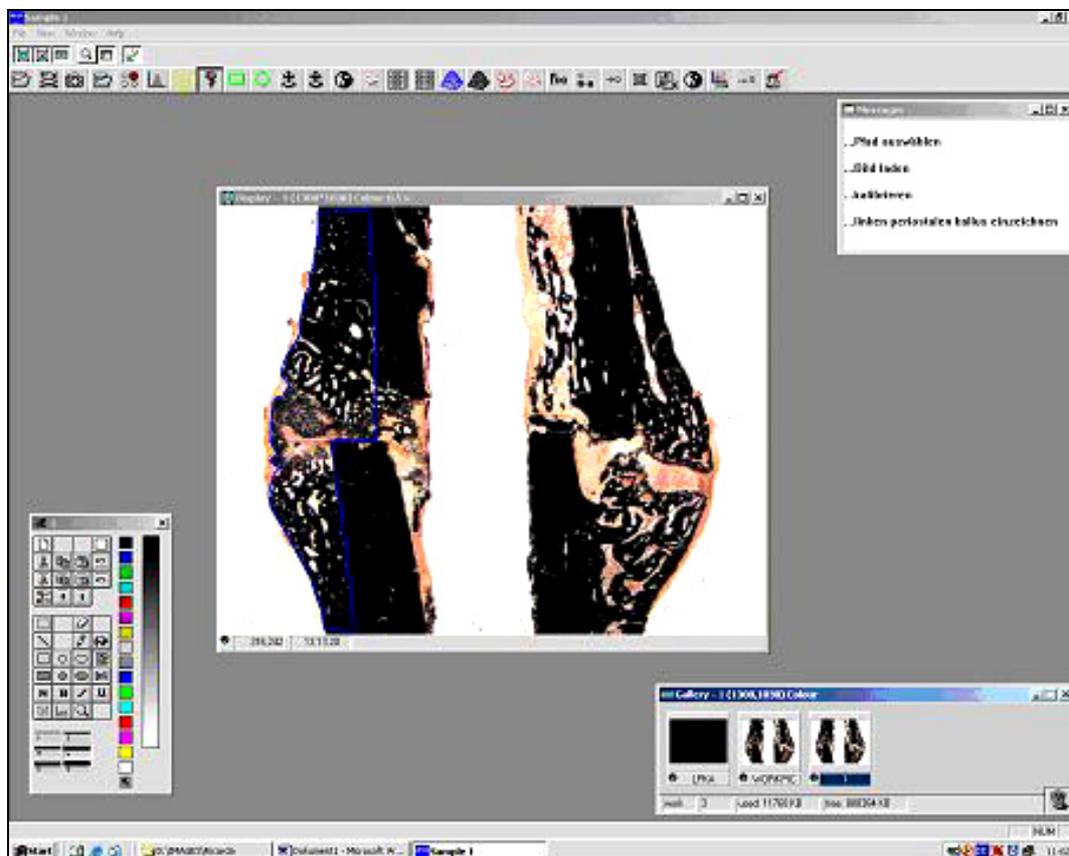


Abb. 10: Definition der periostalen Kallusfläche.

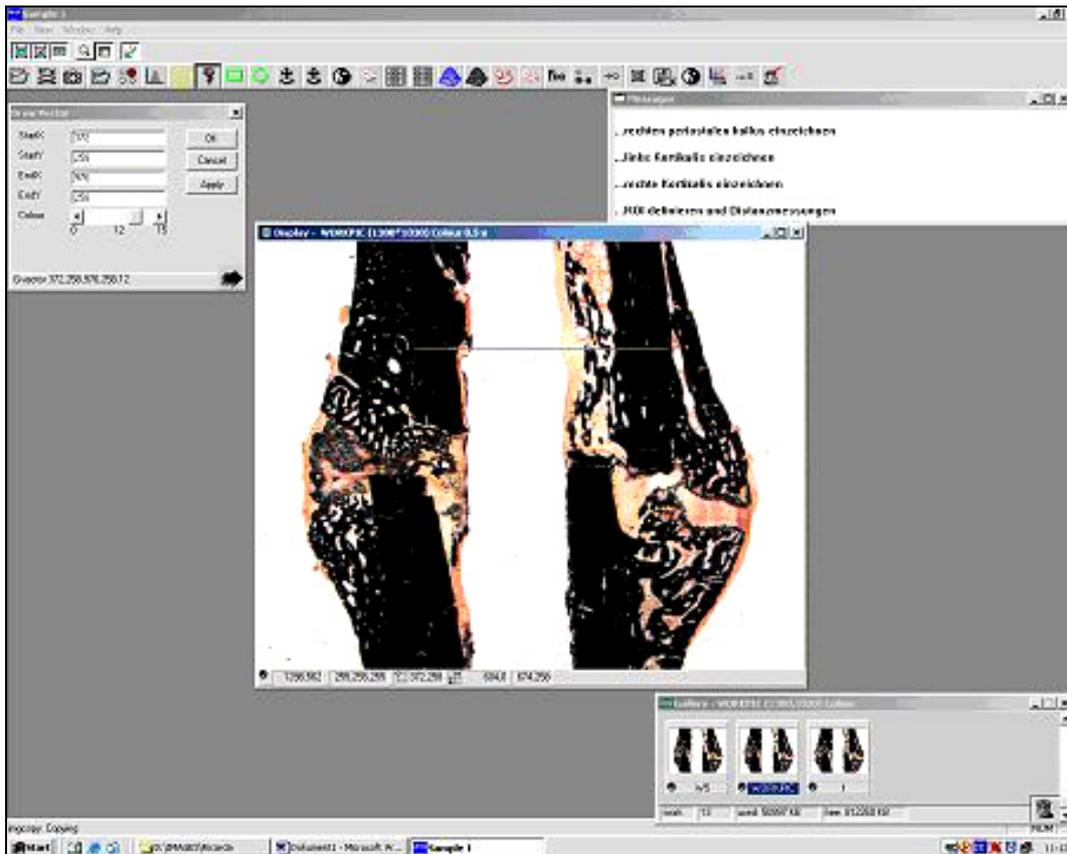


Abb. 11: Bestimmung der Baseline.

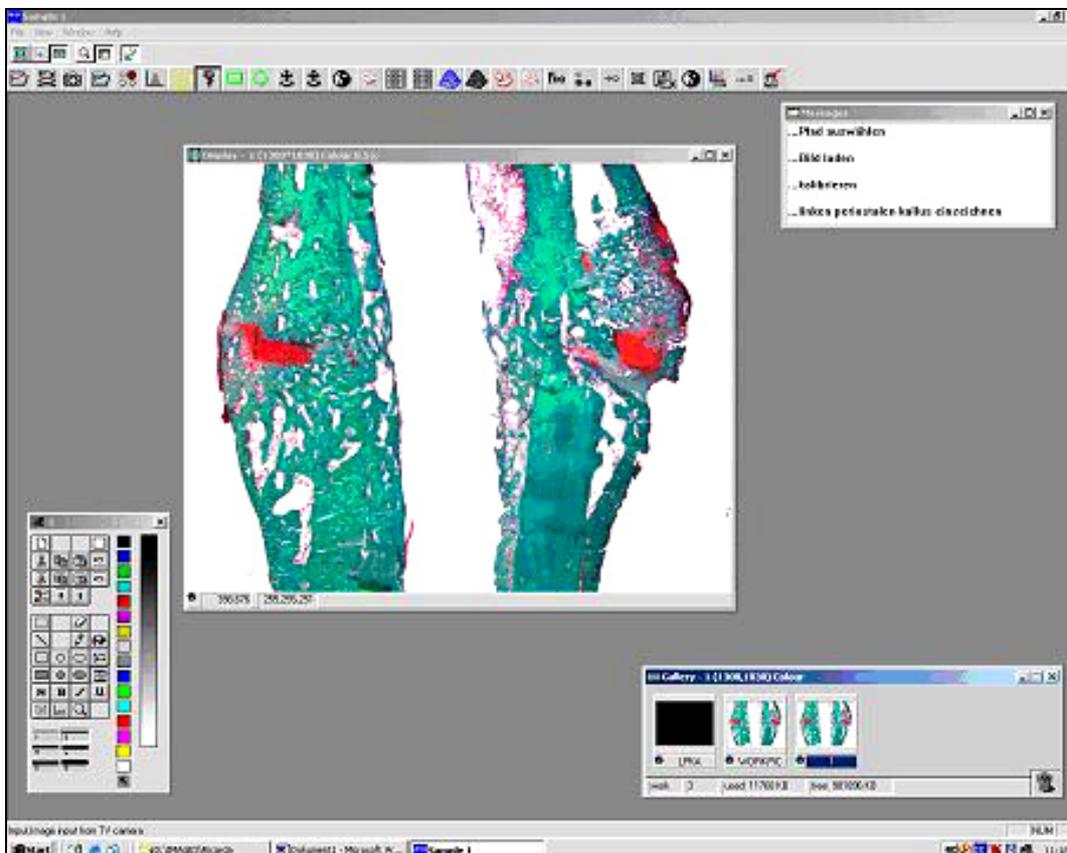


Abb. 12: Safranin O/Lichtgrün-Färbung.

## 5.10. Weitere Methoden des Projektes (Ergebnisse nicht Teil der Promotionsarbeit)

### 5.10.1. Biomechanische Testung

Die biomechanische Testung wurde mit Hilfe einer Torsionstestmaschine für Kleintierknochen durchgeführt. Es wurden das maximale torsionale Drehmoment und die maximale torsionale Steifigkeit sowohl der frakturierten Tibia als auch der unfrakturierten Tibia der kontralateralen Seite nach 28 bzw. 42 Tagen nach Operation ermittelt.

### 5.10.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Dazu verwendet man ein Enzym, die DNA-Polymerase. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten:

1. Denaturierung
2. Hybridisierung
3. Elongation

Diese Methode diente als Sicherheitsnachweis an Tag 2, 4, 7, 28 sowie 42 und wurde an Knochen (frakturierte Tibia), Muskel (Mm. tibiales), Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Ovarien sowie Gehirn durchgeführt. Die Organe wurden auf eine mögliche Transfektion hin untersucht. Luciferase, ein Enzym des Glühwürmchens, wurde dabei als Detektor für das entstandene Genprodukt eingesetzt. Dazu wurde unter Verwendung eines „RNeasy“ Kit® (Qiagen, Hilden, Deutschland) RNA aus den genannten Geweben isoliert und mittels rt-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm bestimmt. In der anschließenden nichtquantitativen PCR wurden Bereiche der Luciferase-Transkripte mit spezifischen Primern (f 5' ctg aat aca aat cac aga atc gtc g 3'; r 5' aaa tcc ctg gta atc cgt ttt aga 3') amplifiziert.

Es wurden die Transfektionsfähigkeit der COPROGs sowie die lokale Expressierung der Gene untersucht.

Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Housekeeping Gen mit ubiquitärem Vorkommen, wurde als Kontrolle für eine erfolgreiche Amplifikation der mRNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch auf 1,5%igem Agarosegel (SERVA, Heidelberg, Deutschland) mittels Ethidiumbromid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nachgewiesen.

### 5.11. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SPSS-Software (SPSS release 14.0, SPSS, Inc., Chicago, Illinois). Signifikanzen wurden, nach Rücksprache mit dem *Institut für Medizinische Biometrie der Charité*, mit dem Kruskal-Wallis-Test, dem Mann-Whitney-U-Test und der Bonferroni-Adjustierung ermittelt.

Das Signifikanzniveau aller Tests beträgt 5% ( $p=0,05$ ). Die Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die radiologischen Scores spiegeln Häufigkeiten wider.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Versuchstoleranz der Tiere, klinischer Verlauf

Die Tiere tolerierten die Operation überwiegend gut und belasteten die frakturierte Extremität innerhalb der ersten beiden Tage nach der Operation voll. Bei einem Tier zeigte sich ein trübes Auge, was auf die Blutentnahme zurückzuführen war. Eine Auswirkung auf die weitere Untersuchung gab es dabei nicht. In sieben Fällen kam es zu Oberbauchabszessen. Alle Tiere stammten aus der gleichen Gruppe (COPROGs+BMP-2 Standzeit: 28d). Möglicherweise war eine Kontamination des Narkotikums ein Grund für diese Erscheinung. Diese Tiere konnten weiter ausgewertet werden. In zwei Fällen zeigten sich Infektionen im Bereich des operierten Beines. Zwei weitere Infekte waren mit Implantatlockerung vergesellschaftet und in zwei anderen Fällen kam es zur Implantatwanderung ohne Infektionszeichen. Einen Einfluss auf die weitere Auswertung in diesen sechs Fällen ergab sich dadurch allerdings nicht.

Insgesamt neun Versuchstiere mussten aus der Auswertung genommen werden. Darunter waren sechs Tiere, die während der Anästhesie verstarben. Ein Tier wurde während des Untersuchungszeitraums tot im Käfig aufgefunden. Eine Ursache war nicht erkennbar. Bei einer Ratte kam es im Heilungsprozess zu einer 180°-Fehlstellung der frakturierten Extremität. Eine weitere Auswertung war dadurch nicht möglich. Während der Aufarbeitung kam es bei einem Knochen zum Präparatebruch.

Aus dem ursprünglich geplanten Versuchsaufbau mit 145 Tieren konnten somit insgesamt 136 Tiere in die Auswertung genommen werden, davon 111 Tiere in die biomechanische (54 Tiere) bzw. histologische (57 Tiere) Auswertung sowie 25 Tiere in die Analyse mittels PCR.

Im peripher-venösen Blut wurden zu den Untersuchungszeitpunkten die folgenden Parameter bestimmt: Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, kleines Blutbild, Glucose, alkalische Phosphatase (AP) und C-reaktives Protein (CRP). Die Analysen des Blutes zeigten während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Des Weiteren konnte laborchemisch im Verlauf keine systemische Infektion oder Reaktion nachgewiesen werden.

Im Verlauf wurde in allen Gruppen eine geringe Gewichtszunahme verzeichnet. Die Messungen der Körperkerntemperatur wiesen keine erheblichen Schwankungen auf. Die Temperatur lag ohne große Abweichung bei ca. 37° C.

## 6.2. Radiologische Ergebnisse

Die radiologischen Kontrollen wurden am Tag der Operation sowie an den Tagen 14, 28 und 42 postoperativ durchgeführt. Es wurden posterior-anteriore und laterale Röntgenaufnahmen angefertigt.

Die Verlaufsuntersuchungen zeigten bei der Mehrzahl der Tiere korrekt und vergleichbar platzierte Implantate. Lockerungszeichen wie z. B. Dislokationen der Implantate konnten in 4 Fällen nachgewiesen werden. Dabei kam es im Heilungsverlauf zu einer geringgradigen Fehlstellung der Extremität. Es wurde keine ektope Knochenbildung im Bereich der abgebildeten Körperabschnitte beobachtet.

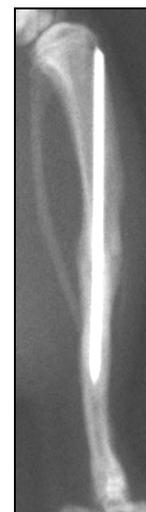
Der Heilungsverlauf der Kontrollgruppe (Abb. 13) stellt beispielhaft die physiologische Frakturheilung dar. In den Verlaufsufnahmen zeigte sich in allen 3 Gruppen eine höhere Rate der Konsolidierung nach 42 Tagen als nach 28 Tagen.



Tag der OP.



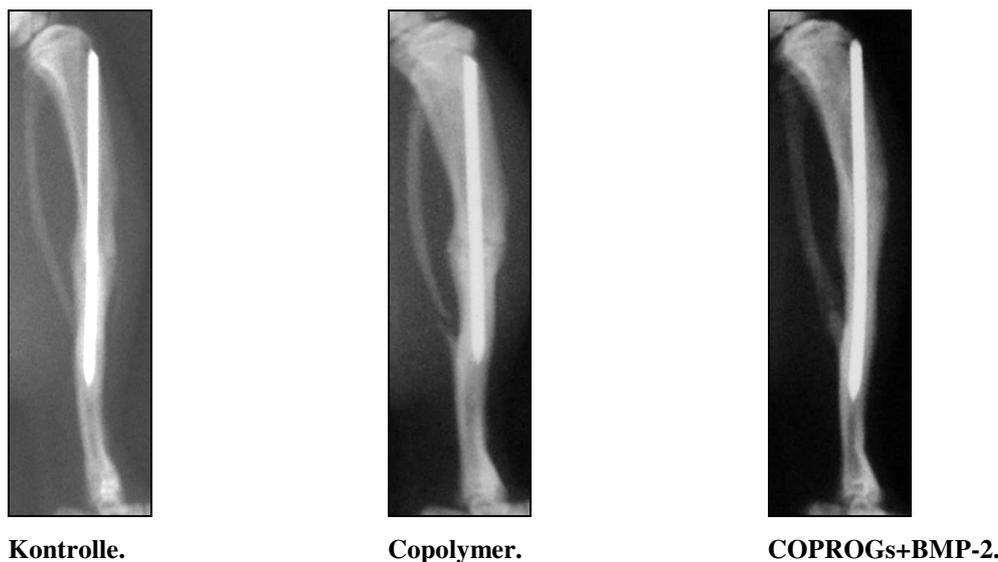
Tag 28 post op.



Tag 42 post op.

**Abb. 13:** Röntgenbild (Seitenaufnahme) der rechten Tibia (Kontrollgruppe) postoperativ, 28 und 42 Tage nach Fraktur. Ein Beispiel für einen physiologischen Heilungsverlauf. Ektope Knochenformationen sind nicht nachweisbar.

Anhand der Röntgenbilder zeigten sich in allen 3 Gruppen ähnliche Heilungsverläufe. In allen 3 Gruppen fand sich zum größten Teil eine teilweise bis vollständige Konsolidierung nach 42 Tagen (Abb. 14). Ein schnellerer Heilungsprozess in Gruppe II (Copolymer) bzw. III (COPROGs+BMP-2) konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 14: Röntgenbilder der 3 Gruppen nach 42 Tagen. Es zeigt sich eine annähernd gleiche Konsolidierung der Fraktur in allen 3 Gruppen. Ektope Knochenformationen sind nicht nachweisbar.**

Die Konsolidierung der Fraktur wurde am 28. und 42. Tag postoperativ von 3 unabhängigen Beobachtern an Röntgenbildern der biomechanisch und histologisch ausgewerteten Tiere bewertet. Mit Hilfe folgender Scoreparameter wurden die Aufnahmen beurteilt (Tab. 6 und 7):

**Tab. 6: Röntgen-Score 28d post op.**

	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2
komplette Überbrückung	6	1	8
inkomplette Überbrückung	10	17	10
keine Überbrückung	2	1	1
Gesamtanzahl n	18	19	19

**Tab. 7: Röntgen-Score 42d post op.**

	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2
komplette Überbrückung	11	14	12
inkomplette Überbrückung	6	4	6
keine Überbrückung	2	0	0
Gesamtanzahl n	19	18	18

Dabei zeigte sich in der Gruppe I (Kontrolle) nach 28 Tagen eine komplette Überbrückung aller Cortices in 6 von 18 Fällen (33,3%). In Gruppe II (Copolymer) und III (COPROGs+BMP-2) kam es in 1 bzw. 8 von 19 Fällen (5,3% bzw. 42,1%) zur kompletten Überbrückung des Frakturspaltes. Eine inkomplette Konsolidierung fand sich bei 10 Tibiae der Gruppe I nach 28

Tagen. Bei 17 Tibiae in der Gruppe II war eine inkomplette Konsolidierung erkennbar. In der Gruppe III ließ sich an 10 Tibiae nach 28 Tagen eine inkomplette Überbrückung des Frakturspaltes nachweisen.

Zum Zeitpunkt 42 Tage nach Fraktur fand sich in der Gruppe I in 17 von 19 Fällen eine teilweise (n=6) oder vollständige Überbrückung (n=11; 57,9%) des Frakturspaltes. In der Gruppe II waren 18 von 18 Tibiae zum gleichen Zeitpunkt inkomplett (n=4) oder komplett (n=14; 77,8%) überbrückt. In 18 von 18 Fällen der Gruppe III wiesen eine unvollständig (n=6) oder vollständige (n=12; 66,7%) Konsolidierung zum gleichen Zeitpunkt auf. Zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten zeigte sich in der Gruppe II die stärkste Zunahme der Konsolidierung. Demnach war nach 28 Tagen eine Tibia komplett konsolidiert, während es an Tag 42 14 der 18 Tibiae in Gruppe II waren. Im Heilungsverlauf zeigten die radiologischen Untersuchungen eine fortgeschrittenere Konsolidierung nach 42 Tagen im Vergleich zum Tag 28 nach Fraktur. Die radiologischen Ergebnisse zeigen einen unkomplizierten Heilungsverlauf in allen 3 Gruppen. Die Gruppe I als auch die Gruppe III scheinen einen initial schnelleren Heilungsbeginn zu haben im Vergleich zur Gruppe II. Es deutet sich allerdings kein Vorteil einer Gruppe bezüglich des Beobachtungstages 42 nach Fraktur an. In keiner der Gruppen zeigten sich Anzeichen für ektopische Knochenformationen.

### **6.3. Histologie**

#### ***6.3.1. Histomorphologische Ergebnisse***

Vor der histologischen Aufarbeitung wurde der Titannagel vorsichtig aus dem Markkanal entfernt. Dabei ist es zu Artefakten der dem Nagel unmittelbar anliegenden Strukturen gekommen. Mikroskopisch ließ sich sowohl nach 28 als auch 42 Tagen ein nur gering ausgebildeter, endostaler Kallus nachweisen. Markraum und endostaler Kallus wurden daher histomorphologisch nicht weiter beurteilt.

In den Übersichtsaufnahmen zeigte sich, dass alle Gruppen sowohl an Tag 28 als auch an Tag 42 nach Fraktur im Heilungsprozess waren. Die Knochenheilung erfolgte in allen Untersuchungsgruppen in erster Linie über die Bildung von periostalem Kallus. Dieser war überwiegend gleichmäßig spindelartig geformt und wies in allen drei Gruppen Anteile von Knochen, Knorpel und Bindegewebe auf. Der periostale Kallus führte in jeder Gruppe zu einer Überbrückung des Frakturspaltes und somit zu einer Verbindung der Fraktarenden. In Höhe des Frakturspaltes fanden sich nach 28 Tagen im periostalen Kallus Knorpel- als auch Bindegewebe,

wobei das Knorpelgewebe eher periostal und das Bindegewebe vor allem im Frakturspalt sichtbar war (Abb. 15). Angrenzend an die knorpeligen Anteile waren großflächig Geflechtknochentrabekel als neu ausgebildeter Knochen erkennbar. Eine teilweise knöcherne Überbrückung dieses Bereiches fand sich nach 42 Tagen in allen drei Gruppen (Abb. 16). In keiner der Gruppen zeigte sich eine komplette knöcherne Überbrückung des Frakturspaltess sowohl 28 als auch 42 Tage postoperativ. Die Versuchstiere aller drei Gruppen zeigten histologisch ein Stadium der sekundären Frakturheilung mit enchondraler Ossifikation (Abb. 17). An beiden Untersuchungszeitpunkten (28 und 42 Tage post op) fanden sich weder Nekrosen noch sonstige pathologische Veränderungen.

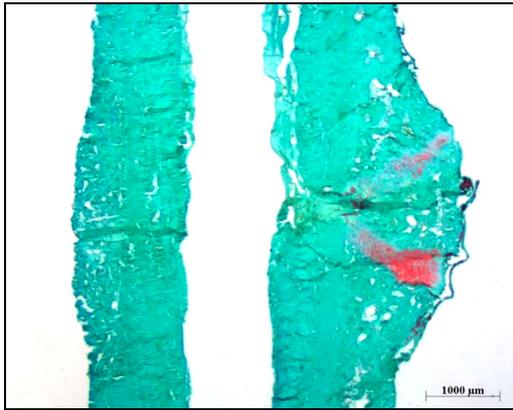
Am Tag 28 nach Fraktur zeigte sich in der Kontrollgruppe weniger Knorpelgewebe im Vergleich zu den anderen Gruppen. Im periostalen Kallusgewebe ließ sich in der Copolymer- als auch COPROGs+BMP-2-Gruppe deutlich Knorpelgewebe erkennen.

Am Tag 42 nach Fraktur stellte sich der periostale Kallus aller Gruppen stärker ossifiziert dar im Vergleich zu Tag 28 nach Fraktur.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 15 und 16) sind exemplarisch histologische Schnitte der untersuchten Tibiae 28 bzw. 42 Tage nach Setzung der Fraktur dargestellt. Die histologischen Schnitte wurden mit Safranin O/Lichtgrün und mit der Versilberung nach v. Kossa gefärbt. In der Versilberung erscheint mineralisierter Knochen schwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und Knorpel und andere Gewebe braun. In der Safranin O/Lichtgrün-Färbung wird Knorpel intensiv rot, Knochen und Bindegewebe grün angefärbt.

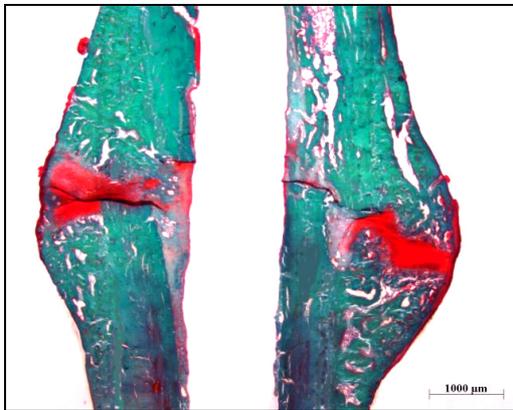
**Safranin O/Lichtgrün-Färbung**

**von Kossa-Färbung**



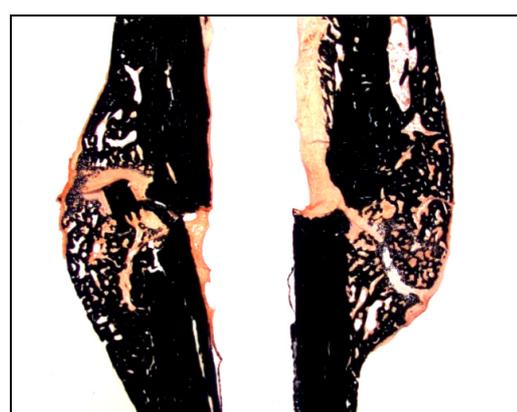
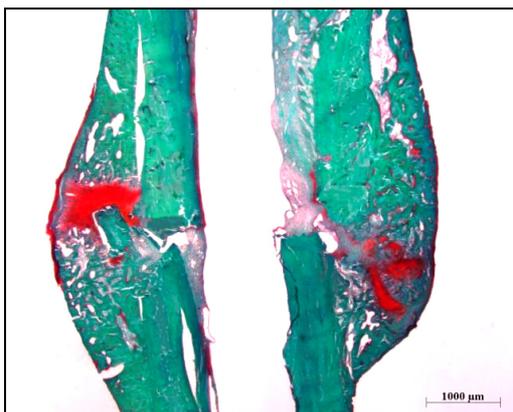
**Kontrollgruppe (unbeschichtet).**

**Kontrollgruppe (unbeschichtet).**



**Copolymer.**

**Copolymer.**



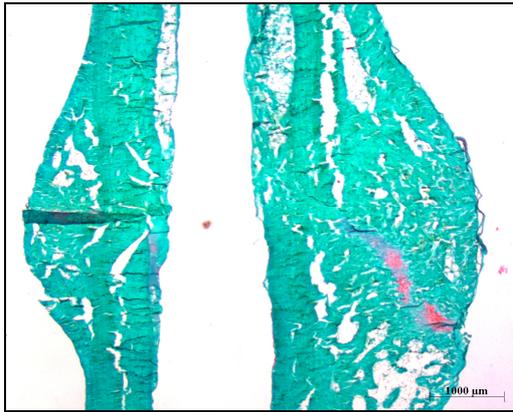
**COPROGs+BMP-2.**

**COPROGs+BMP-2.**

**Abb. 15: Histologische Schnitte (sagittal) der Tibiae 28 Tage nach der Fraktur. Färbung der Präparate mit Safranin O/Lichtgrün und Versilberung v. Kossa. Fibröse und knorpelige Anteile stellen sich in der Safranin O/Lichtgrün-Färbung rot, mineralisierte Anteile grün dar. In der Versilberung v. Kossa sind Knochen und Mineralisationsfronten schwarz gefärbt, Knorpel und andere Gewebe färben sich braun. Es zeigt sich deutlich Knorpel in den Gruppen II (Copolymer) und III (COPROGs+BMP-2), wobei der größte Knorpelanteil in Gruppe II (Copolymer) sichtbar ist.**

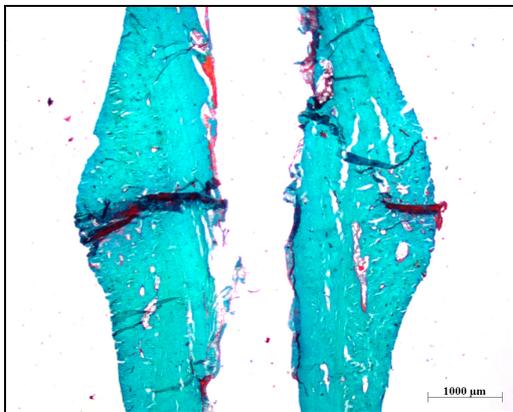
**Safranin O/Lichtgrün-Färbung**

**von Kossa-Färbung**



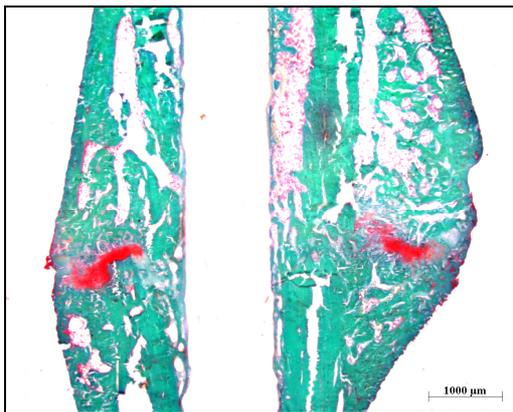
**Kontrollgruppe (unbeschichtet).**

**Kontrollgruppe (unbeschichtet).**



**Copolymer.**

**Copolymer.**



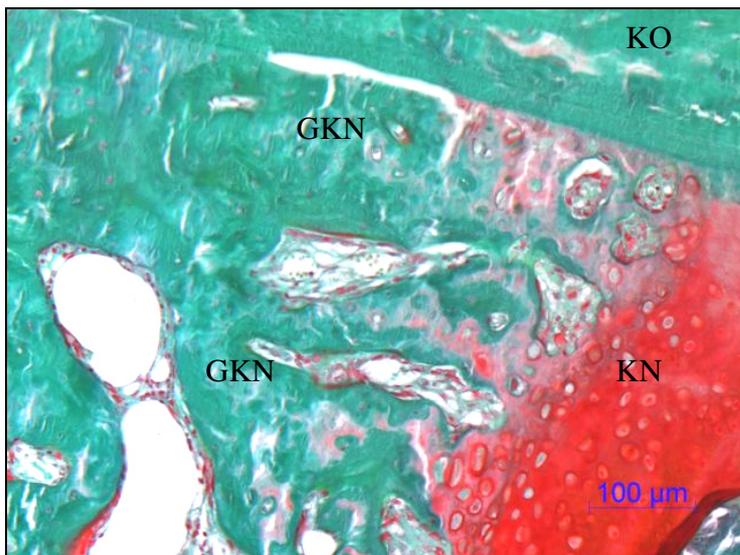
**COPROGs+BMP-2.**

**COPROGs+BMP-2.**

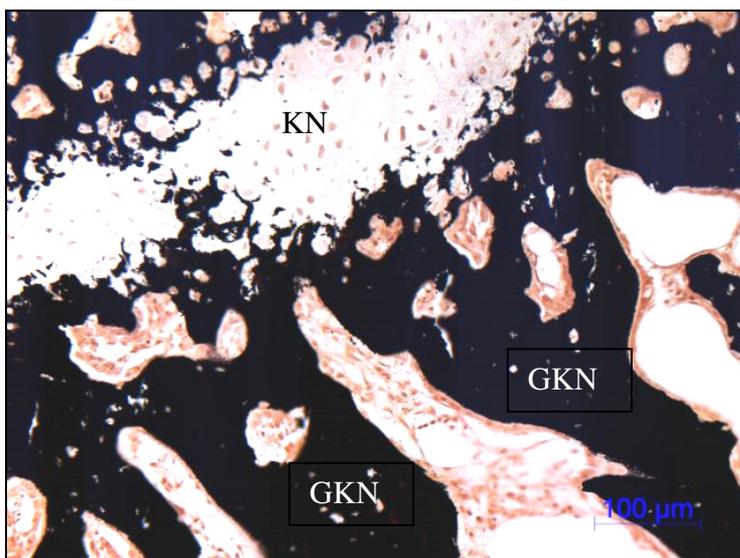
**Abb. 16: Histologische Schnitte (sagittal) der Tibiae 42 Tage nach der Fraktur. Es zeigt sich im Vergleich zu den in Abb. 15 dargestellten Tibiae eine stärkere Mineralisation in allen 3 Gruppen. Knorpelanteile sind in allen Gruppen sichtbar.**

Betrachtete man sich die Detailaufnahmen der COPROGs+BMP-2-Gruppe 28 Tage nach OP (Abb. 17), so ließen sich kräftige Knochen trabekel von Geflechtknochen erkennen (grün). Diese waren in ihrer Struktur weniger geordnet als der Lamellenknochen der Kortikalis. Daneben fanden sich Osteoblasten (grün gefärbte Zellen), die von nicht mineralisierter Grundsubstanz, dem sog. Osteoid umgeben waren. Es ließen sich außerdem in der Safranin O/Lichtgrün-Färbung im Knorpelgewebe (rot gefärbt) reichlich Chondrozyten nachweisen.

**Färbung „Safranin O/Lichtgrün“**



**Versilberung nach „von Kossa“**



**Abb. 17:** Beispielhafte Detailaufnahmen von Geweben im Bereich des periostalen Kallus in Safranin O/Lichtgrün und Versilberung von Kossa 28 Tage nach Fraktur in der COPROGs+BMP-2-Gruppe. Knorpelgewebe stellt sich rot bzw. braun dar, mineralisiertes Gewebe bzw. Knochen werden grün sowie schwarz in der jeweiligen Färbemethode angefärbt. KO: Kortikalis, KN: Knorpel, GKN: Geflechtknochen

### 6.3.2. Histomorphometrische Ergebnisse

Für die Histomorphometrie wurde die Kallusregion der Tibia mit dem Bildanalyseprogramm KS400 ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

#### Tibiadurchmesser (Baseline)

Der Tibiadurchmesser (Baseline) der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zeigte am Tag 42 nach Fraktur einen signifikanten Unterschied ( $p=0,006$ ) zwischen der Kontrollgruppe und der COPROGs+BMP-2-Gruppe. Dabei war die Baseline der COPROGs+BMP-2-Gruppe geringer als die der Kontrollgruppe. Der Parameter diente als Bezugsgröße für die histomorphometrische Auswertung (Tab. 8).

**Tab. 8: Histomorphometrische Ergebnisse der Baseline (Tibiadurchmesser).**

Baseline (mm)	28d			42d		
	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+ BMP-2	Kontrolle	Copolymer	COPROGs +BMP-2
	2,6 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,2	<b>2,7<math>\pm</math>0,1<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup>  $p=0,006$ ; signifikant zur Kontrollgruppe bei gleichem Untersuchungszeitpunkt

#### Mineralisierter Knochenanteil der Kortikalis

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung bezüglich des mineralisierten Anteils der Kortikalis dargestellt (Tab. 9).

**Tab. 9: Histomorphometrische Ergebnisse der Kortikalis.**

Mineralisierter Knochenanteil der Kortikalis (%)	28d			42d		
	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+ BMP-2	Kontrolle	Copolymer	COPROGs +BMP-2
	97,9 $\pm$ 1,3	97,4 $\pm$ 1,0	<b>95,4<math>\pm</math>1,5<sup>a</sup></b>	97,2 $\pm$ 0,9	97,2 $\pm$ 0,9	97,1 $\pm$ 1,2

<sup>a</sup>  $p=0,003$ ; signifikant zur Kontrollgruppe bei gleichem Untersuchungszeitpunkt

Am Tag 28 nach Fraktur zeigte sich ein signifikant geringerer mineralisierter Knochenanteil im Bereich der Kortikalis in der COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (95,4 $\pm$ 1,5% vs. 97,9 $\pm$ 1,3%,  $p=0,003$ ). Zwischen 28 und 42 Tagen nach Fraktur kam es zu einem Zuwachs des mineralisierten Knochenanteils kortikal in der COPROGs+BMP-

2-Gruppe, während dieser Anteil in den beiden anderen Versuchsgruppen tendenziell abnahm. Es zeigten sich allerdings keine Signifikanzen zwischen den Gruppen.

Am 42. Tag nach Fraktursetzung wiesen alle 3 Gruppen einen ähnlichen mineralisierten Anteil im Bereich der Kortikalis auf.

Ausdehnung des periostalen Kallus (Periosteal Callus Area/ Baseline in mm)

Am Tag 28 war die periostale Kallusausdehnung in der COPROGs+BMP-2-Gruppe am größten, während die Kontrollgruppe die geringste Kallusausdehnung aufzeigte (Tab. 10). Eine Zunahme der Ausdehnung fand sich am Tag 42 in der Copolymer und COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppe. Die Ausdehnung des periostalen Kallus in der Kontrollgruppe blieb zwischen beiden Zeitpunkten annähernd gleich. Es fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

**Tab. 10: Histomorphometrische Ergebnisse der Ausdehnung des periostalen Kallus.**

Ausdehnung des periostalen Kallus (mm)	28d			42d		
	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2
	5,0±0,9	5,2±0,9	5,5±1,9	5,0±1,3	6,4±1,8	6,8±2,4

Mineralisierte Anteile periostal (Mineralized Area/ Periosteal Callus Area in %)

Die Ergebnisse der mineralisierten Anteile periostal sind für beide Untersuchungszeitpunkte in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 11) dargestellt:

**Tab. 11: Histomorphometrische Ergebnisse der mineralisierten Anteile periostal.**

Mineralisierte Anteile periostal (%)	28d			42d		
	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2
	77,9±6,4	71,4±6,4	<b>64,0±11,2<sup>a</sup></b>	79,4±9,3	73,9±9,3	71,0±11,6

<sup>a</sup>p=0,006; signifikant zur Kontrollgruppe bei gleichem Untersuchungszeitpunkt

Zum Zeitpunkt 28 Tage nach Fraktur zeigte sich in der COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppe ein signifikant geringerer mineralisierter Anteil periostal im Vergleich zur Kontrollgruppe (64,0±11,2% vs. 77,9±6,4%; p=0,006). Die mineralisierten Anteile nahmen am Tag 42 in allen 3 Gruppen im Vergleich zum Tag 28 zu. Höchster mineralisierter Anteil periostal fand sich in der

Kontrollgruppe ( $79,4 \pm 9,3\%$ ). Die größte Zunahme des mineralisierten Anteils zwischen beiden Zeitpunkten zeigte sich in der COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppe (von  $64,0 \pm 11,2\%$  auf  $71,0 \pm 11,6\%$ ). Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen am 42. Tag.

Knorpelige Anteile (Cartilage Area/ Total Callus Area in %)

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung bezüglich der knorpeligen Anteile dargestellt.

**Tab. 12: Histomorphometrische Ergebnisse der knorpeligen Anteile.**

	28d			42d		
Knorpelige Anteile periostal (%)	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2	Kontrolle	Copolymer	COPROGs+BMP-2
	5,3±4,2	9,6±5,2	5,1±3,6	6,0±4,5	6,3±3,3	5,3±4,6

Es wurden in allen 3 Gruppen an beiden Zeitpunkten knorpelige Anteile periostal nachgewiesen. Der größte prozentuale Knorpelanteil nach 28 Tagen fand sich in der COPROGs-Gruppe mit  $9,6 \pm 5,2\%$ . Die Kontrollgruppe als auch die COPROGs+BMP-2-Gruppe wiesen ähnliche prozentuale Anteile des Knorpelgewebes auf ( $5,3 \pm 4,2\%$  und  $5,1 \pm 3,6\%$ ).

Eine Abnahme des periostalen Knorpelanteils an Tag 42 nach Fraktur ließ sich im Vergleich zum Tag 28 in der Copolymer behandelten Versuchsgruppe erkennen ( $9,6 \pm 5,2\%$  vs.  $6,3 \pm 3,3\%$ ). In der Kontroll- als auch der COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppen nahm der prozentuale Anteil des Knorpels zwischen beiden Zeitpunkten gering zu. Es fanden sich an beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

**6.4. Biomechanische Ergebnisse (Ergebnisse nicht Teil dieser Promotionsarbeit)**

Nach der Tötung wurden die intramedullären Implantate vorsichtig aus den Tibiae entfernt und die Knochen für die biomechanische Testung vorbereitet. Die Marknägeln konnten leicht gezogen werden ohne Unterschied zwischen den Gruppen. Die Daten der mechanischen Testung wurden direkt mit der kontralateralen nicht-frakturierten Tibia des gleichen Tieres verglichen. Im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe zeigte die COPROGs+BMP-2-beschichtete

Gruppe am 42. postoperativen Tag ein signifikant ( $p=0,008$ , Vergleich mit der Kontrollgruppe) erhöhtes maximales Drehmoment (Abb. 18). In der Steifigkeit konnte an keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe (unbeschichtet) und der BMP-2-beschichteten Gruppe nachgewiesen werden.

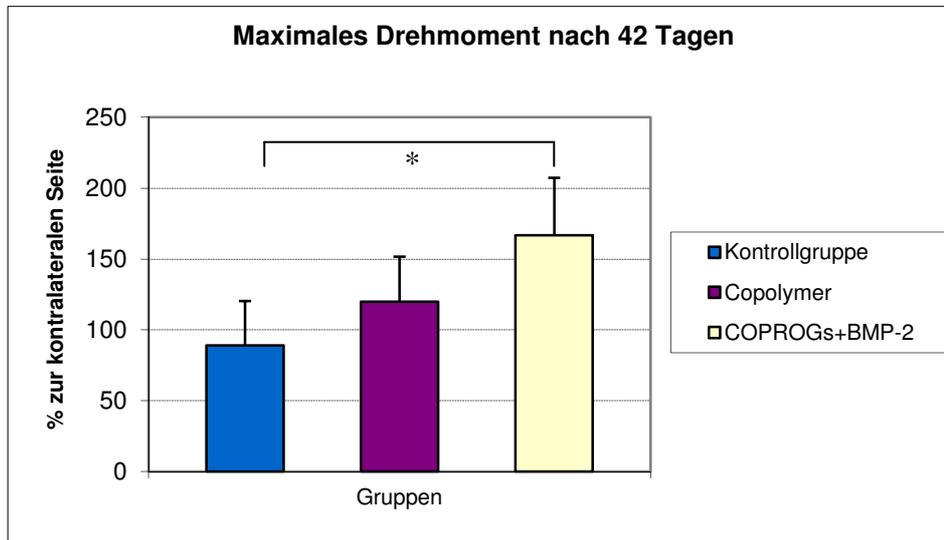


Abb. 18: Maximales Drehmoment der 3 Gruppen nach 42 Tagen.  $*(p=0,008)$

### 6.5. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Ergebnisse nicht Teil dieser Promotionsarbeit)

Die PCR diente als Sicherheitsnachweis und wurde an Knochen (frakturierte Tibia), Muskel (Mm. tibiales), Herz, Lunge, Leber, Milz, Nieren, Ovarien sowie Gehirn durchgeführt. Es wurde die Transfektionsfähigkeit der COPROGs an Tag 2, 4, 7, 28 und 42 untersucht. Als Detektor wurde Luciferase, ein Enzym des Glühwürmchens, eingesetzt. Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als sog. Housekeeping-Gen. Das Enzym kommt ubiquitär in Zellen vor.

In der Analyse wurde die Transfektionsfähigkeit der COPROGs bestätigt. Es fand eine Genexpression im Bereich der frakturierten Tibia statt. In den restlichen untersuchten Gewebeproben wurde keine Expression des Luciferase-Gens festgestellt.

## 7. Diskussion

Störungen in der Frakturheilung sind mit den heute zur Verfügung stehenden etablierten Verfahren nicht immer ausreichend zu therapieren. Der Einsatz von Wachstumsfaktoren wie die BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) stellt hierbei einen möglichen Lösungsansatz dar.

Das BMP-2 (INFUSE® Bone Graft, Medtronic Sofamor Danek, Memphis, U.S.A. und InductOs®, Wyeth, Münster, Deutschland) gilt als eine der potentesten heilungsstimulierenden Substanzen und ist für den klinischen Einsatz eingeschränkt zugelassen. Es ist ein rekombinant humanes Protein, das über Trägermaterialien appliziert wird. Die Nachteile eines Proteins sind die kurze Halbwertszeit, eine kostenintensive Herstellung und mögliche immunologische Antworten. Eine mögliche Alternative ist die Gentherapie. Der genetische Code der meisten Wachstumsfaktoren ist bekannt, so dass mit der lokalen Applikation der Plasmide im Zielgewebe eine Expression des gewünschten Proteins (z. B. BMP-2) erreicht werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem gentherapeutischen Ansatz BMP-2-Plasmide mit Hilfe eines nicht-viralen Vektors lokal in das Zielgewebe Knochen appliziert, was dazu führen sollte, dass das gewünschte Protein vor Ort exprimiert wird, um die Zelldifferenzierung bzw. das Zellwachstum zu stimulieren. Dabei ist das BMP-2-Plasmid in einem neu entwickelten nicht-viralen Vektor (COPROG - *Copolymer Protected Gene Vector*) inkorporiert, welcher in eine PDLA-Beschichtung eingearbeitet ist.

Zu zwei Heilungszeitpunkten wurden im Bereich der Fraktur histomorphologische Untersuchungen durchgeführt und verschiedene Parameter histomorphometrisch ausgewertet. In biomechanischen Untersuchungen wurden die torsionale Steifigkeit sowie das maximale Drehmoment bestimmt.\* In einer weiteren Untersuchung wurde die Transfektionsfähigkeit der COPROGs sowie die lokale Expression der Gene untersucht.\* (\* Diese Untersuchungen sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse wurden nur zusammenfassend aufgeführt.)

Im Rahmen eines Vorversuches wurden die Transfektionsfähigkeit des non-viralen Vektors sowie die Transkription von BMP-2 *in vitro* an primären Rattenosteoblasten bewiesen [Schwabe 2012]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch *in vivo* kein stimulierender Effekt von COPROGs+BMP-2 auf die Frakturheilung nachgewiesen werden.

## 7.1. Diskussion der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Studien

Die radiologische Auswertung mithilfe eines Röntgenscores zeigte keinen Vorteil der BMP-2-Gruppe gegenüber der anderen beiden Vergleichsgruppen nach 28 bzw. 42 Tagen. Es gab keinen Hinweis auf einen initial schnelleren Heilungsbeginn der mit COPROGs+BMP-2 behandelten Frakturen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die histologische Untersuchung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Vorteil der COPROGs+BMP-2 behandelten Gruppe. Demnach kam es bei den COPROGs+BMP-2 behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner fortgeschritteneren bzw. beschleunigten Knochenheilung. Histomorphologisch konnte in allen Gruppen ein ähnlicher Kallusaufbau nachgewiesen werden. Ein heilungsverzögernder Effekt auf die Frakturheilung durch die Applikation von COPROGs+BMP-2 zeigte sich nicht.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass der non-virale Vektor mit integriertem BMP-2-Plasmid die Frakturheilung stimuliert, konnte *in vivo* nicht bestätigt werden. Ursächlich für den im Versuch signifikant niedrigen Tibiadurchmesser (Baseline) am Tag 42 nach Fraktur in der COPROGs+BMP-2-Gruppe ist vermutlich die biologische Varianz der Tiere.

Gegensätzlich zu den radiologischen als auch histologischen Ergebnissen zeigte sich in der biomechanischen Untersuchung ein signifikant erhöhtes maximales Drehmoment für die COPROGs+BMP-2-beschichtete Gruppe am 42. postoperativen Tag. In der Steifigkeit konnte an keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der BMP-2-beschichteten Gruppe nachgewiesen werden.

In der PCR-Analyse wurde eine Genexpression im Bereich der frakturierten Tibia nachgewiesen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es zu keiner systemischen Transfektion kam. Das verwandte Vektorsystem konnte damit in seiner Funktion bestätigt werden.

Gegensätzlich zu den Ergebnissen des vorliegenden Versuchs wurde der stimulierende Effekt von BMP-2 bereits mehrfach in präklinischen und auch klinischen Studien belegt [Einhorn 2003, Govender 2002, Seeherman 2004]. In mehr als 3000 Veröffentlichungen wurden Untersuchungen zu BMPs in Zell- und Tierversuchen durchgeführt [Simpson 2006]. Als einer der ersten *in vivo*-Versuche mit non-viralem, gentherapeutischem Ansatz bleibt die Vergleichbarkeit mit anderen Studien jedoch eingeschränkt. Unterschiede im Versuchsdesign (z. B. verschiedene Therapieschemata, Dosierungen und Trägermaterialien) erschweren zusätzlich einen direkten Vergleich von Studien [Gautschi 2009].

In Zellversuchen wurde sowohl die Stimulation von Osteoblasten als auch von Osteoklasten durch BMP-2 nachgewiesen [Cheng 2003, Itoh 2001]. Der stimulierende Effekt von rekombinantem BMP-2 auf humane mesenchymale Stammzellen in der Differenzierung zu Osteoblasten wurde in *in vitro*-Versuchen im frühen Differenzierungsstadium durch Erhöhung der Expression von alkalischer Phosphatase nachgewiesen [Kim 2008]. Wildemann *et al.* konnten in einem *in vitro*-Versuch zeigen, dass BMP-2 auch auf Osteoklasten wirkt und deren Resorptionsaktivität signifikant erhöhen kann [Wildemann 2005A]. Auch in vorherigen Untersuchungen konnte dieser steigernde Effekt auf die Osteoklastenaktivität nachgewiesen werden [Kaneko 2000].

Neben der Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten vermag BMP-2 Apoptose zu induzieren. Gautschi *et al.* zeigten in einem *in-vitro* Versuch mit immortalisierten, humanen fetalen Osteoblasten, dass unter anderem die Applikation von rekombinantem BMP-2 dosisabhängig die Zellproliferationsrate senkt und die Apoptoserate erhöht [Gautschi 2009]. Apoptose ist ein physiologischer Regulator, der im Fall der Frakturheilung das Gleichgewicht zwischen Knochenneubildung und unerwünschtem Wachstum hält. BMP-2 spielt somit in diesem Regelkreis eine bedeutende Rolle.

Fasst man die beschriebenen Eigenschaften von BMP-2 zusammen, so kann gemutmaßt werden, dass eine Gabe von BMP-2 bei der Frakturheilung undifferenzierte mesenchymale Stammzellen rekrutiert, die Differenzierung von Osteoblasten herbeiführt, Apoptose in Osteoblasten induziert aber auch Osteoklasten aktiviert.

In der vorliegenden Studie kam es durch den Einsatz von BMP-2 zu keiner verbesserten Heilung. Möglicherweise kam es zu einer unzureichenden Stimulation und Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen, so dass eine zu geringe Osteoblastendifferenzierung stattfand. Als ursächlich könnte eine nicht ausreichende Dosierung des BMP-2-Plasmids diskutiert werden, die dazu führte, dass notwendige zelluläre Prozesse nicht suffizient angeregt wurden.

In einer *in vivo*-Studie untersuchten Schmidmaier *et al.* unter einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von rhBMP-2 auf die Frakturheilung. Es zeigte sich radiologisch, biomechanisch als auch histomorphometrisch ein Vorteil der rhBMP-2-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [Schmidmaier 2002A]. Das dem BMP-2 bereits mehrfach zugeschriebene hohe osteoinduktive Potenzial wurde durch diese Studie bestätigt.

In klinischen Studien konnten ebenfalls Vorteile für die Nutzung von rhBMP-2 gezeigt werden. Govender *et al.* verglichen 3 Therapieoptionen für die offene Tibiafraktur an insgesamt 450 Patienten. Im Follow up nach 12 Monaten zeigte sich ein deutlicher Vorteil in der Behandlung

mittels interner Nagelfixation und Einsatz von rhBMP-2 mit einer Dosis von 12 mg. Es kam zu einer signifikant schnelleren Fraktur- und Wundheilung und weniger Infektionen im Vergleich zur Kontrollgruppe [Govender 2002].

Swiontkowski *et al.* führten ebenfalls eine prospektive, randomisierte klinische Studie an Patienten mit offener Tibiafraktur durch. Dabei wurden bei der internen Nagelfixation der „Standard of care“ gegen rhBMP-2/ACS (absorbierbarer Kollagenschwamm) verglichen. Es konnte auch in dieser Studie gezeigt werden, dass der Einsatz von rhBMP-2 zur signifikanten Reduktion von Knochentransplantationen und Zweiteingriffen führt [Swiontkowski 2006].

Gegensätzlich zu dem beschriebenen stimulierenden Potenzial von BMP-2 finden sich in der Literatur Arbeiten, in denen eine BMP-2-Gabe keinen Vorteil brachte. In einer Untersuchung von Lyon *et al.* konnte kein signifikanter Vorteil der BMP-2-behandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Patienten wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Es wurde die Applikation von rhBMP-2/Calcium-Phosphat-Matrix (CPM) gegen den „Standard of care“ verglichen. Es zeigte sich weder in der medianen Zeit bis zur kompletten radiologischen Konsolidierung noch in der Zeit bis zur Normalfunktion ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Als mögliche Ursache wurde die hohe Dispersion von rhBMP-2/CPM in der Nähe der Fraktur und die dadurch lokal niedrige Konzentration diskutiert, die es nicht ermöglichte, eine genügend hohe Anzahl an mesenchymalen Stammzellen zu rekrutieren [Lyon 2013].

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Applikation sein. So benutzte Schmidmaier *et al.* PDLA als Trägermaterial für rhBMP-2, Govender *et al.* als auch Swiontkowski *et al.* legten Kollagenschwämme mit rhBMP-2 direkt über die Fraktur. Beide Verfahren scheinen eine optimale Freisetzung von rhBMP-2 herbeizuführen, so dass es zu einem stimulierenden Effekt des Wachstumsfaktors und somit zu einer schnelleren Frakturheilung nach Applikation von rhBMP-2 kam. Dagegen wurde in der Studie von Lyon *et al.* rhBMP-2/CPM perkutan injiziert, was keinen signifikanten Vorteil für die Wachstumsfaktor-Gruppe brachte. Als mögliche Ursache wurde die hohe Dispersion von rhBMP-2/CPM um die Fraktur herum diskutiert, so dass ein schneller Abfall der Bioverfügbarkeit resultierte. Folglich kam es zu einer niedrigen Wirkstoffkonzentration, um mesenchymale Stammzellen für die Frakturheilung zu rekrutieren. Vermutet wurde außerdem, dass minimale Veränderungen in der Carrierherstellung möglicherweise schon zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können [Lyon 2013].

Abgesehen von den biologischen Mechanismen spielt die Dosis von BMP-2 ebenfalls eine wichtige Rolle.

In einer Studie von Angle *et al.* wurde ein künstlich erzeugter Knochendefekt im Femur der Ratte mit einem absorbierbaren Kollagenschwamm und rhBMP-2 versorgt. Es wurden 4 verschiedene Konzentrationen von rhBMP-2 gegen eine Kontrollgruppe untersucht. Dabei zeigte sich, dass jede rhBMP-2 behandelte Gruppe neue Knochenformationen aufwies, die sich jedoch in der Knochendichte unterschieden. In den radiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die optimale Dosis des rhBMP-2 bei 12 µg lag und es jenseits dieser Dosis zu einer geringeren Stimulation der Knochenneubildung kam. Vermutet wurde, dass eine höhere Dosis von rhBMP-2 initial die Resorption von Geflechtknochen durch eine höhere Osteoklastenaktivität stimuliert und dadurch die Knochenbildung supprimiert [Angle 2012].

Fang *et al.* testeten in einem Osteotomie-Modell verschiedene Konzentrationen für BMP-4 und PTH1-34 (Aminosäuren 1-34 des Parathormons)-kodierende Plasmid-DNA am Rattenfemur unter Verwendung von Kollagenschwämmen als Carriersystem. Die Dosis der Plasmid-DNA betrug dabei 0,5-1,0 mg. Nach 4 Wochen ließen sich erste Knochenformationen nachweisen [Fang 1996]. Allerdings lagen die DNA-Dosierungen 10-25fach höher als in der vorliegenden Studie.

In einer weiteren Studie von Bonadio *et al.* wurde eine dosisabhängige Knochenneubildung untersucht und beschrieben. Als genaktivierte Matrix wurde in einen Knochendefekt ein Schwamm mit unterschiedlicher DNA-Dosis (1-100 mg) hPTH 1-34 codierende DNA eingesetzt. Nach 12 Wochen konnte gezeigt werden, dass bei einer Dosis von 100 mg eine stetige Knochenneubildung stattfand. Nach 6 Wochen waren bis zu 75% der Defekte mit neuem Knochen gefüllt. Bei einer Dosis von 40 mg DNA waren nach 4 Wochen 25% des Defektareals mit Knochen gefüllt. Eine weitere Knochenneubildung in den folgenden Wochen konnte jedoch kaum nachgewiesen werden. Bei Dosen von 1-20 mg DNA konnte keine Knochenneubildung nachgewiesen werden [Bonadio 1999].

Eine zu niedrige Konzentration könnte daher auch der Grund sein, warum es im vorliegenden Versuch keinen klaren Vorteil für den Einsatz der COPROGs+BMP-2-beschichteten Implantate gab. Mit einer Konzentration von 40 µg pro Implantat war die Menge der DNA unter Umständen zu gering für die ausreichende Bildung von BMP-2, um eine schnellere Frakturheilung herbeizuführen. Generell wäre es daher wichtig, die *in vitro* gewonnenen optimalen Dosen auch *in vivo* im Rahmen einer Dosisfindungsstudie zu überprüfen.

Gegensätzlich zu der Annahme, dass die im Versuch gewählte Dosis zu gering war, untersuchten Reckhenrich *et al.*, ob ein BMP-2-COPROG-aktiviertes, PDLLA-beschichtetes Poly-

Caprolacton-Gerüst die Differenzierung relevanter Zellen herbeiführen kann und dadurch die Knochenheilung beschleunigt sowie die Integrität der biodegradierbaren Materialien unterstützt. Die optimale Dosis für die Proteinbildung in diesem *in vitro*-Versuch lag bei 30 µg DNA. Bei Dosierungen von 45 bzw. 60 µg DNA kam es dagegen zu keiner Steigerung der Proteinsynthese. Die metabolische Aktivität der Zellen ließ mit einer Dosis von 45 bzw. 60 µg pDNA signifikant nach im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie der Gruppe mit 15 bzw. 30 µg pDNA [Reckhenrich 2012]. Dieser Vergleich ist allerdings nur bedingt sinnvoll, da es sich bei Reckhenrich *et al.* um einen *in vitro*-Versuch handelte.

Generell sind Vergleiche zu Dosierungen nur eingeschränkt möglich, da es sich in den verschiedenen Studien einerseits um rekombinant hergestellte Proteine handelt, die mittels unterschiedlicher Trägermaterialien appliziert werden, andererseits bei gentherapeutischem Ansatz verschiedene Vektorsysteme zum Einsatz kommen. Des Weiteren sind *in vitro* und *in vivo* Studien nicht direkt miteinander vergleichbar. So wurde gezeigt, dass die Freisetzung von rhBMP-2 *in vivo* schneller ablaufen kann als *in vitro* [King 2012]. Dabei werden die Freisetzungskinetiken sowohl durch die Implantatumgebung mit ihren verschiedenen Zelltypen und sezernierten Enzymen als auch durch den individuellen Gewebeaufbau beeinflusst. Diese komplexen Wechselbeziehungen können *in vitro* nur eingeschränkt dargestellt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse deuten somit daraufhin, dass Art, Dosis und Freisetzungskinetik von Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für den Therapieerfolg spielen. Höchstwahrscheinlich müssen all diese Eigenschaften für jedes Tiermodell und jeden klinischen Fall angepasst und optimiert werden [Luginbuehl 2004].

## 7.2. COPROGS

Beim Einsatz von rekombinant hergestellten Proteinen zur Stimulation der Frakturheilung führt ein initialer Peak der Freisetzung sowie ein schneller Abbau der Proteine zu deren eingeschränkter, therapeutischer Nutzung *in vivo*. Während die Halbwertszeit der Proteine Minuten bis Stunden beträgt, benötigt die Frakturheilung als Prozess Wochen bis Monate [Baltzer 1999]. Um eine langsame, kontinuierliche Freisetzung von BMP zu erreichen, wurden Überlegungen angestellt, wie man die Applikation verbessern konnte.

Eine mögliche Alternative zur Nutzung rekombinanter Proteine stellt die Gentherapie dar. Die Gene können lokal den am Heilungsprozess beteiligten Zellen zugeführt werden, so dass diese die Gene aufnehmen und kontinuierlich das gewünschte Protein (z. B. BMP-2) bilden.

In der Gentherapie genutzte Vektoren können in virale und non-virale Vektoren eingeteilt werden. Die am meisten genutzten viralen Vektoren sind die Adenoviren. Sie können in großen Mengen hergestellt werden und transfizieren sowohl sich teilende als auch nicht-teilende Zellen [Kofron 2006]. Größter Nachteil ist jedoch das hohe immunogene Potenzial der Viren in der ersten Generation. Neuere Generationen der Adenoviren sind dagegen weniger immunogen [Pelinkovic 2001]. Um die Nebenwirkungen zu umgehen, wurden daher nicht-virale Vektoren entwickelt, bei denen es z. B. zu einer geringeren Entzündungsreaktion als beim Einsatz viraler Vektoren kommt [Fischer 2011].

In der vorliegenden Arbeit wurden sog. COPROGs (Copolymer-protected gene vectors) in der Frakturheilung getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die non-virale Applikation eines BMP-2-Plasmids aus COPROGs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Transfektion des Plasmids führte [Schwabe 2012]. Es zeigte sich eine Gentransfektion aus dem Trägermaterial in die Zielzellen als auch die Genexpression im Zielgewebe. Damit kann die Eingangsthese gestützt werden, dass COPROGs in der Lage sind Zellen zu transfizieren und eine Genexpression hervorzurufen.

Allerdings ist die Transfektionseffizienz nicht-viraler Vektorsysteme geringer als die viraler Vektorsysteme. Franceschi *et al.* fanden heraus, dass die zelluläre Aufnahmeleistung aus nicht-viralen Vektoren lediglich  $10^{-9}$  von dem viraler Vektoren entspricht [Franceschi 2000]. Schwabe *et al.* zeigten, dass es einen initialen Peak in den ersten 7 Tagen in der Transkription des eingebrachten Gens zu geben scheint, dass allerdings an Tag 28 und 42 nur noch sehr geringe Mengen des Gens transkribiert werden [Schwabe 2012]. Um eine längerfristig höhere Menge an BMP-2 im Zielgewebe zu erreichen, wäre es daher denkbar die Konzentration von COPROGs im Trägermaterial zu erhöhen.

Scherer *et al.* zeigten in einem Versuch Vorteile einer PEI/DNA-PROCOP (protective copolymer)-Verbindung gegenüber anderen nicht-viralen Vektoren und nackter DNA. Untersucht wurde die Freisetzung aus dem Vektor, das Zellwachstum und die Expression der Reportergene *in vitro* und *in vivo*. Nackte DNA-beladenes Kollagen verlor 77% der DNA-Dosis in einem initialen Peak *in vitro*. Bezüglich des Zellwachstums zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Expression des Reportergens *in vitro* war für nackte DNA nicht länger als 7 Tage nachweisbar, während die anderen Gruppen eine Langzeitexpression bis zu 56 Tage hatten. Das höchste Expressionslevel fand sich in der PEI-DNA/PROCOP-Verbindung. *In vivo* zeigte sich keine Luciferase-Expression mit nackter DNA. Die höchsten Expressionslevel der Reportergene für mindestens 7 Tage ergaben sich in der PEI-DNA/PROCOP-Gruppe [Scherer 2002B].

Im vorliegenden Versuch wurde ebenfalls die oben beschriebene PEI-DNA/PROCOP-Verbindung angewandt [Finsinger 2000]. Der fehlende, eindeutige Effekt auf die Frakturheilung durch die Anwendung des Copolymer-geschützten BMP-2-Plasmids könnte auch damit zusammenhängen, dass BMP-2 erst aus der Plasmid-DNA über die Schritte der Proteinsynthese hergestellt werden muss. Dabei muss die Plasmid-DNA in ausreichender Menge den Zellkern erreichen, BMP-2 in mRNA transkribiert werden und weiter in das funktionsfähige Protein translatiert werden. Hierbei sind verschiedene Regulationsmechanismen auf Zellebene vorhanden, die die Herstellung und Wirkung von BMP-2 im Zielgewebe einschränken könnten. Zum einen ist dies der direkte Abbau der Plasmid-DNA durch Nukleasen, zum anderen kann die Transkription des BMP-2-Gens reprimiert sein bzw. die mRNA des Gens einem schnelleren Abbauzyklus unterliegen [Baek 2008]. Außerdem sind verschiedene Kontrollen in der Translation sowie im Proteinabbau bekannt, welche die Menge des zur Verfügung stehenden Proteins und damit letztendlich die Wirkung beeinflussen.

Eine weitere Ursache für die Ergebnisse dieser Studie könnte ein im Herstellungsprozess entstandenes inhomogenes PDLLA/COPROGs-Gemisch sein. So wurden die Plasmide eventuell nicht gleichmäßig auf die Implantate verteilt. Die Beschichtung erfolgte über eine Nagellänge von ca. 3,5 cm, so dass nur ein Teil der Plasmide in unmittelbarer Frakturhöhe freigesetzt wurde. Möglicherweise kann die inkorporierte BMP-2-DNA am distalen und proximalen Ende des Implantats aufgrund der Entfernung nicht auf die in Frakturspaltnähe befindlichen Zellen wirken und somit die Knochenheilung stimulieren. Des Weiteren wurden die Nägel bei der Implantation gekürzt, so dass gut 1/3 der Plasmide als auch der Beschichtung verloren gingen und für den Heilungsprozess nicht mehr zur Verfügung standen.

Trotz dieser nicht geklärten Fragen zeigt der Versuch, dass der neu entwickelte Vektor den Sicherheitsaspekt für eine lokale Applikation erfüllt - ein systemischer Nachweis der Genprodukte fand nicht statt. Die Daten sprechen für ein sicheres Vektor-System in dieser Studie, was ebenso bedeutend erscheint, wie der Wirkeffekt des Systems selbst.

### **7.3. Die Poly[D,L-Laktid]-Beschichtung**

Grundsätzlich werden verschiedene Anforderungen an lokale Applikationssysteme gestellt. Sie sollen zum einen die Wirkung der Wachstumsfaktoren optimal gewährleisten, zum anderen deren biologische Aktivität für optimale Effekte ausreichend sicherstellen. Sie müssen resorbierbar sein und durch Knochen ersetzt werden können [Einhorn 1995]. Ein weiterer

wichtiger Aspekt ist die kontinuierliche und kontrollierte Freisetzung der Wirksubstanz, da sich bei vorzeitiger Resorption die Wirkung nicht ausreichend entfalten könnte. Experimentell wurden verschiedene Wege untersucht BMP-2 zu applizieren.

Eine Möglichkeit bietet die lokale Injektion. So konnte gezeigt werden, dass eine einzige, lokale, perkutane Injektion von rhBMP-2 eine beschleunigte Frakturheilung in einem Frakturmodell der Ratte hervorrufen konnte [Einhorn 2003]. Allerdings wird mit einer Injektion ein Minitrauma erzeugt, das den Heilungsprozess stören und eine Eintrittspforte für Keime darstellen kann. Außerdem könnten Residuen von Trägermaterialien mit integrierten Wachstumsfaktoren zu heterotopen Knochenformationen im Bereich der Injektionsstelle führen. Andere Möglichkeiten Wachstumsfaktoren zu applizieren bieten die sog. „Carriersysteme“. Praktisch für den klinischen Einsatz ist ein biodegradierbares, poröses Trägermaterial, aus dem eine kontrollierte Freisetzung der Wirksubstanzen stattfindet [Hollinger 1997].

Eines dieser Trägermaterialien ist der Fibrinkleber. Dieser wird seit mehr als 30 Jahren in der Klinik angewendet und zeigt keine limitierenden bzw. negativen Eigenschaften bei der Implantateinheilung [Faensen 2011]. Allerdings zeigten Faensen *et al.* in ihrem Versuch, dass es zu einer systemischen Expression des Reportergens Luciferase in 15 von 72 Organproben kam. Vermutet wurde, dass durch den erhöhten intramedullären Druck Fibrinkleber zusammen mit dem Reportergen aus dem Markkanal gepresst wurde, sodass sich das Reportergen dann durch Eindringen in lokale Blutgefäße systemisch verteilen konnte [Faensen 2011]. Diese Ergebnisse könnten zu einer Limitierung von Fibrinkleber als Trägermaterial für intramedulläre Kraftträger führen.

Ein weiteres organisches Carriersystem ist das Kollagen. Kollagene können in Form von Schwämmen, Streifen, Membranen oder Gelen eingesetzt werden [Kirker-Head 2000]. Allerdings sind Kollagenschwämme zum Teil aus bovinem Material und können eine Antikörperbildung induzieren [Burkus 2011] oder allergische Reaktionen hervorrufen. Darüber hinaus wurde für Kollagenschwämme eine schnelle und nicht kontinuierliche Freisetzung eingearbeiteter Substanzen beschrieben [Sørensen 1990].

Im vorliegenden Versuch wurden Kirschner-Titandrähte mit einer PDLLA-Beschichtung verwendet. In PDLLA eingearbeitete Wirksubstanzen unterliegen, nach einem initialen Peak innerhalb der ersten 48 Stunden, einer kontinuierlichen Freisetzung über sechs Wochen [Schmidmaier 2001B]. Neben einer kontrollierten Freisetzung spielt auch die mechanische Stabilität des Trägermaterials eine wichtige Rolle. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche zeigten, dass es durch mechanischen Abrieb nur zu einem geringen Verlust von etwa fünf Prozent des

Beschichtungsmaterial kam [Schmidmaier 2001B]. Eine weitere, wichtige Anforderung an das Trägermaterial ist die Biokompatibilität, um Immunreaktionen, Toxizität und andere Nebenwirkungen zu reduzieren. In der vorliegenden Studie gab es weder klinisch noch radiologisch, histologisch oder biomechanisch Anzeichen für negative Wirkungen der PDLLA-Beschichtung. Auch in anderen Studien unter Einsatz von PDLLA traten zu keiner Zeit Anzeichen für Fremdkörperreaktionen oder andere Nebenwirkungen auf [Back 2012, Pauly 2012, Schmidmaier 2002A, Wildemann 2005B]. Durch Hydrolyse kommt es zum vollständigen Abbau von PDLLA, so dass keine toxischen Metabolite entstehen. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bereits die alleinige Beschichtung des Osteosynthesematerials mit PDLLA die Frakturheilung positiv beeinflusst. Eine vollständige Erklärung für diesen Effekt gibt es derzeit noch nicht. Man vermutet allerdings, dass das saure Milieu, das bei der Hydrolyse des Laktids entsteht, einen stimulierenden Effekt auf die Wachstumsfaktoren und Stoffwechselfvorgänge im Kallus ausübt [Raschke 2002; Schmidmaier 2001A u. B].

In dieser Arbeit konnte bezüglich histomorphometrischer und radiologischer Auswertungen kein signifikanter Vorteil der mit PDLLA-beschichteten Gruppen im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe beobachtet werden. Allerdings kam es im Beobachtungszeitraum in der PDLLA+Copolymer-behandelten Gruppe zum größten Zuwachs kompletter Konsolidierung (1 zu 14 Tiere; siehe *Kap. 6.2.*). Möglicherweise kam in dieser Gruppe der stimulierende Effekt des sauren Milieus beim Abbau von PDLLA zum Tragen, wie bereits oben beschrieben bei Raschke *et al.* und Schmidmaier *et al.* vermutet wurde.

Die Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung wird zurzeit klinisch erprobt und kommt beispielsweise in Verbindung mit Gentamicin als eingearbeitetes Antibiotikum als Beschichtung für intramedulläre Tibianägel bei offenen Unterschenkel-Frakturen zur Vorbeugung von Infektionen zum Einsatz [Lucke 2003, Fuchs 2011]. Weitere klinische Anwendungsbeobachtungen erfolgen gegenwärtig in einer internationalen Studie [<http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/2012-1/05ortho.html>].

#### **7.4. Das Tiermodell**

Als Versuchstiere wurden in der vorliegenden Arbeit adulte, weibliche Sprague Dawley Ratten verwendet. Ratten dienen bereits in einer Vielzahl von experimentellen Untersuchungen zur Frakturheilung als Versuchstiere [Einhorn 2003, Schmidmaier 2001A u. 2002A]. Die Wahl einer

oft eingesetzten Tierspezies ermöglicht die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen.

Eine wichtige Rolle zur Vergleichbarkeit spielt neben der geeigneten Versuchstierart ein standardisiertes Verfahren zum Setzen einer Fraktur. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit das von Schmidmaier *et al.* entwickelte Frakturmodell verwendet [Schmidmaier 2004]. Somit sind Vergleiche mit anderen Studien der Arbeitsgruppe und mit Arbeitsgruppen, die die gleiche Methodik verwenden, möglich, was von großer Bedeutung für die Interpretation von Ergebnissen aus verschiedenen Versuchen ist.

Allerdings muss hervorgehoben werden, dass Tiermodelle meist schwierig übertragbar sind, da sie nicht der realen *in vivo*-Situation im Patienten entsprechen. Beispielsweise zeigten Diefenderfer *et al.* wesentliche Unterschiede in der Regulation des BMP-Signalwegs und im Regulationsmechanismus der alkalischen Phosphatase bei humanen Knochenmarkszellen und vermuten einen Unterschied zwischen humanen und murinen Zellen [Diefenderfer 2003]. Des Weiteren kann ein Tiermodell keine Begleiterkrankungen, vorherigen Operationen, vorausgegangenen Weichteilschäden sowie die dadurch eingeschränkte Belastung der zu untersuchenden Extremität nachahmen. Die Übertragbarkeit der in Tiermodellen erhaltenen Ergebnisse ist weiterhin limitiert durch die Tatsache, dass meist junge Tiere für die Studien verwendet werden [Gautschi 2007]. Es ist außerdem nicht sicher, dass in Mensch und Tier gleiche Metabolisierungsraten herrschen [Lieberman 2002].

Die prinzipielle Anwendbarkeit („proof of principle“) des gewählten Versuchsaufbaus konnte in dieser Arbeit demonstriert werden. Es ist denkbar, weitere Dosisfindungsstudien und andere Untersuchungsmethoden, z. B. immunhistochemische Verfahren, im Rahmen der Grundlagenforschung in einem Versuch mit Ratten zu nutzen, um weitere Erkenntnisse *in vivo* zu gewinnen. Würde sich hierbei eine Effektivität und weiterhin die Sicherheit der lokalen Gentherapie zeigen, wäre ein Versuch mit Großtieren denkbar. Die im Kleintiermodell gewonnenen Erkenntnisse könnten verifiziert und gegebenenfalls verbessert bzw. angepasst werden.

## **7.5. Klinische Relevanz und Ausblick**

Im Zuge einer immer älter werdenden Bevölkerung gewinnen heutzutage infolge von Osteoporose entstehende Frakturen zunehmend an Bedeutung [Egermann 2005]. Diese Frakturen heilen schlechter und stellen eine entscheidende Ursache für Morbidität sowie Mortalität bei

älteren Menschen dar [Egermann 2006]. Die Kosten zur Behandlung und Rehabilitation solcher Frakturen sind immens [Lippuner 2005].

Neben der autologen Knochentransplantation haben in beschränkter klinischer Zulassung zwei BMPs (BMP-2 und BMP-7) das therapeutische Feld zur Unterstützung der Frakturheilung erweitert. Diese werden zurzeit in rekombinanter Form eingesetzt. Bis Ende 2007 wurden nahezu eine Million Patienten aufgrund wirbelsäulenchirurgischer, traumatologischer oder kieferchirurgischer Krankheitsbilder mit rhBMPs behandelt [Pecina 2007]. Dabei kam es zu nicht unerheblichen Nebenwirkungen. So analysierten Carragee *et al.* in einer Arbeit mehrere FDA-Dokumente und unveröffentlichte Originaldaten, in denen rhBMP-2 in der Wirbelsäulenchirurgie therapeutisch eingesetzt wurde. Dabei kam es je nach operativem Zugangsweg schätzungsweise zwischen 10 und 50 % zu unerwünschten Folgeerscheinungen nach Einsatz des Wachstumsfaktors (Kompression von Nerven und Atemwegen, erhöhte Infektionsrate, Implantatlockerung bzw. -verlust, Osteolysen, retrograde Ejakulation sowie Harnverhalt) [Carragee 2011]. Woo *et al.* analysierten ebenfalls FDA-Dokumente zum Einsatz von rhBMP-2 bei Frakturen im Bereich der langen Röhrenknochen. Unerwünschte Nebenwirkungen (heterotope Knochenformationen, Pseudarthrosen, Infektionen, Ödembildung, Osteolysen, Kompartmentsyndrom sowie periphere Nervenläsionen) führten in 48% zu Zweiteingriffen. Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass in 49 der 62 Fälle rhBMP-2 im „off label use“ zum Einsatz kam. Es konnte auch nicht klar der Zusammenhang zwischen der Nutzung von rhBMP-2 und Folgeerscheinungen wie z. B. Infektionen, Ödeme, Kompartmentsyndrom oder Nervenläsionen hergestellt werden, da diese Erscheinungen auch zu den Risiken bzw. Komplikationen von Operationen zählen. Heterotope Knochenformationen zeigten sich ausschließlich nach „off label use“ von rhBMP-2. Die meisten Fälle von Pseudarthrosen wurden ebenfalls nach „off label use“ nachgewiesen. Nichtsdestotrotz zeigt die Auswertung, dass Folgeerscheinungen nach Gebrauch von rhBMP-2 bei nicht zugelassener Indikation möglich sind [Woo 2013].

Alternativ zu dieser kostenintensiven und nicht unproblematischen Behandlungsform erscheint jedoch die potenziell kostengünstigere Anwendung von Wachstumsfaktoren in einem gentherapeutischen Therapieansatz. Gerade die guten operativen Zugangswege von Frakturen (z. B. langer Röhrenknochen) bieten die Möglichkeit der lokalen Gentherapie. Kombiniert man das Ganze mit Implantaten zu sog. „bioaktiven Implantaten“, so könnte die Frakturheilung stimuliert und die Komplikationsrate reduziert werden.

Es sind jedoch weitere Untersuchungen bezüglich der optimalen Dosierung *in vivo* sowie des Trägermaterials sinnvoll und notwendig. Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess durch das

Zusammenspiel vieler Wachstumsfaktoren und Regulationsmechanismen und bedarf möglicherweise nicht nur der Applikation eines einzelnen Wachstumsfaktors oder eines Wachstumsfaktor kodierenden Plasmids, um eine Stimulation der Heilungsvorgänge zu erreichen.

Allerdings muss bei einem gentherapeutischen Ansatz auch immer die Sicherheit des gewählten Systems im Vordergrund stehen. Dabei sollte die Erforschung möglicher Risiken (z. B. Immunreaktion des Körpers) eine wichtige Rolle spielen. Somit sind Anwendbarkeit und Sicherheit in gentherapeutischen Ansätzen zwei gleichzusetzende Aspekte.

Für nachfolgende Untersuchungen werfen die Ergebnisse der vorliegenden Studie folgende Fragen auf:

1. Ist das *in vitro* ermittelte Dosisoptimum für das Plasmid auch das Dosisoptimum *in vivo*?
2. Wird BMP-2 in der Zelle tatsächlich als Protein exprimiert und in ausreichender Menge freigesetzt?
3. Sind andere Trägermaterialien möglicherweise eine Alternative?
4. Sind Kombinationen aus verschiedenen Wachstumsfaktoren möglich und zeigen diese einen schnelleren positiven Effekt auf die Frakturheilung?

Zur Beantwortung dieser Fragen sind weiterführende immunhistochemische, *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen notwendig.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008; 87(2):107-118.
- [2] Alden T, Pittman D, Hankins G, Beres E, Engh J, Das S, Hudson S, Kerns K, Kallmes D, Helm G. In vivo enchondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1999; 10:2245-2253.
- [3] Alt V, Heissel A. Economic considerations for the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures in Europe: the German model. *Curr Med Res Opin* 2006; 22(Suppl 1):19-22.
- [4] Angle SR, Sena K, Sumner DR, Virkus WW, Viridi AS. Healing of rat femoral segmental defect with bone morphogenetic protein-2: A dose response study. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2012, 12(1):28-37.
- [5] Aspenberg P, Wang E, Thorngren KG. Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not. *Acta Orthop Scand* 1992; 63(6):619-622.
- [6] Back D, Pauly S, Rommel L, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B, Greiner SH. Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, 13:42.
- [7] Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455:64-73.
- [8] Bañon-Plaza A, Van der Meulen MCH. A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing. *J Ther Biol* 2001; 212:191-209.
- [9] Baltzer A, Lattermann C, Whalen JD, Braunstein S, Robbins PD, Evans CH. A gene therapy approach to accelerating bone healing. Evaluation of gene expression in a New Zealand white rabbit model. *Knee Surg* 1999; 7:197-202.
- [10] Baltzer A, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss L, Grimm M, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* 2000; 7:734-739.
- [11] Baltzer A, Lieberman JR. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther* 2004; 11(4):344-350.
- [12] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14(11): 1805-1815.
- [13] Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Egermann M, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Vrahas MS, Bouxsein ML, Evans CH. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther* 2007; 14(13):1039-1044.

- [14] Bier, A. Observations on regeneration in humans. XII. Essay. Regeneration of bones. 2. Pseudo-arthritis. Deut Med Wochenschr 44 1918; 452-456.
- [15] Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. Int Orthop 2007
- [16] Bonadio J, Goldstein SA, Levy RJ. Gene therapy for tissue repair and regeneration. Adv Drug Deliv Rev. 1998; 33(1-2):53-69.
- [17] Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. Nature Medicine 1999; 5(7):753-759.
- [18] Burkus JK, Gornet MF, Glassman SD, Slosar PJ, Rosner MK, Deckey JE, Nowak J, Hatcher BM. Blood serum antibody analysis and long-term follow-up of patients treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the lumbar spine. Spine 2011; 36(25):2158-67.
- [19] Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 1988; 81(2):277-281.
- [20] Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell 1980; 22(2):479-488.
- [21] Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. Spine J 2011; 11(6):471-91.
- [22] Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(24):9843-9847.
- [23] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factor 2004; 22(4):233-241.
- [24] Chen Y, Cheung KMC, Kung H-F et al. In vivo new bone formation by direct transfer of adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-4 gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 298:121-127.
- [25] Chen Y, Luk KD, Cheung KM et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. Gene Therapy 2003; 10:1345-1353.
- [26] Cheng H, Jiang W, Phillips FM et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am. 2003; 85A(8):1544-1552.
- [27] Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. J Bone Miner Res 2002; 17:513-520.

- [28] Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg* 2000; 43(4):256-262.
- [29] Cotten M, Wagner E, Zatloukal K et al. High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6094-6098.
- [30] Coventry M, Nolan D, Bukenbauch R. "Delayed" prophylactic anticoagulation: a study of results and complications in 2012 total hip arthroplasties. *J Bone and Joint Surg* 1973; 55(7):1487-1492.
- [31] Dash PR, Read ML, Barrett LB et al. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* 1999; 6:643-50.
- [32] Diefenderfer DL, OsyczkaAM, Garino JP, Leboy PS. Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone Mirow stromal cells. *J Bone Joint Surg AM* 2003; 85A(3):19-28.
- [33] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005; 36(12):1392-1404.
- [34] Ducy P, Karsenty G. The family of the bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 2000; 57:2207-2214.
- [35] Dyer MR, Herrling PL. Progress and potential for gene-based medicines. *Mol Ther* 2000; 1(3):213-224.
- [36] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. *J Gene Med* 2004; 6(6):597-602.
- [37] Egermann M, Schneider E, Evans CH, Baltzer AW. The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005; 16(Suppl 2):120-128.
- [38] Egermann M, Baltzer AW, Adamszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, Lill CA. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther* 2006; 17(5):507-517.
- [39] Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77(6):940-56.
- [40] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 1998; (355 Suppl):7-21.
- [41] Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of rhBMP-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85A(8):1425-1435.
- [42] Evans CH. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(12):1331-1340.

- [43] Fang J, Zhu Y, Smiley E et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5753-5758.
- [44] Faensen B, Wildemann B, Hain C, Höhne J, Funke Y, Plank C, Stemberger A, Schmidmaier G. Local application of BMP-2-specific plasmids in fibrin glue does not promote implant fixation. *BMC Musculoskelet Disord* 2011 Jul 15; 12:163.
- [45] Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Cullis P, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, Wu G. Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 1997; 8(5):511-512.
- [46] Finsinger D, Remy JS, Erbacher P, Koch C, Plank C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Therapy* 2000; 7(14):1183-1192.
- [47] Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R. Future of local bone regeneration-protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg.* 2011; 39(1):54-64.
- [48] Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: In vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem.* 2000; 78:476-486.
- [49] Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung 2010; <http://www.nanolifescience.de/forschung/genvektoren.html>
- [50] Friedmann T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am* 1997; 276(6):96-101.
- [51] Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Raschke MJ. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011; 131(10):1419-1425.
- [52] Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 2007; 77(8):626-631.
- [53] Gautschi OP, Cadosch D, Zellweger R, Joesbury KA, Filgueira L. Apoptosis induction and reduced proliferation in human osteoblasts by rhBMP-2, -4 and -7. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(1):53-60.
- [54] Göpferich A. Bioresorbable polymers as drug delivery systems. *Biomaterials in surgery*; Walenkamp G., Ed.; Thieme: Stuttgart, New York 1998.
- [55] Govender S, Csimma C, Genant HK et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients, *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A(12):2123-2134.
- [56] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2009; 31:1825–1835.

- [57] Hallek M, Winnacker EL. Ethische und juristische Aspekte der Genterapie. Herbert Utz Verlag, München 1999.
- [58] Health Department of the United Kingdom Gene Therapy Advisory Committee. Guidance on making proposals to conduct gene therapy research on human subjects. *Hum Gene Ther* 2001; 12:71-720.
- [59] Hollinger JO, Schmitz JP. Macrophysiologic roles of a delivery system for vulnerary factors needed for bone regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 831:427-437.
- [60] Itoh K, Udagawa N, Katagiri T et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 2001; 142(8):3656-3662.
- [61] Joyce M, Jingushi S, Bolander M. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990; 21(1):199-209.
- [62] Kaito T, Myoui A, Takaoka K, Saito N, Nishikawa M, Tamai N, Ohgushi H, Yoshikawa H. Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite. *Biomaterials* 2005; 26(1):73-79.
- [63] Kaneko H, Arakawa T, Mano H et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000; 27(4):479-486.
- [64] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9(1):49-61.
- [65] Kim IS, Song YM, Cho TH et al. In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation. *Dev Growth Differ* 2008; 50(7):553-564.
- [66] King WJ, Krebsbach PH. Growth factor delivery: How surface interactions modulate release in vitro and in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(12):1239-1256.
- [67] Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 43:65-92.
- [68] Kishimoto KN, Watanabe Y, Nakamura H, Kokubun S. Ectopic bone formation electroporatic transfer of bone morphogenetic protein-4 gene. *Bone* 2002; 31(2):340-347.
- [69] Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1):7-19.
- [70] Knowledge Enterprises, Inc. Dorlands Biomedical 2000; [https://www.orthoworld.com/docs/pdf/world\\_orthomarket/wwo\\_2000.pdf](https://www.orthoworld.com/docs/pdf/world_orthomarket/wwo_2000.pdf)
- [71] Kofron MD, Laurencin CT. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58(4):555-576.

- [72] Kulkarni RK, Pani KC, Neumann C, Leonard F. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg* 1966; 93(5):839-843.
- [73] Kullmer M. Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern. Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe. 2006; [http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6429/1/Kullmer\\_Martin.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6429/1/Kullmer_Martin.pdf)
- [74] Laurencin C, Lane JM. Poly(lactic acid) and Poly(glycolic acid): Orthopaedic Surgery Applications. In: Brighton C, Friedlaender G, Lane JM, editors. *Bone Formation and Repair*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994:325-339.
- [75] Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O’Brodivich H, Lukacs GL. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999; 6:482-497.
- [76] Lechardeur D, Verkman AS, Lukacs GL. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(5): 755-767.
- [77] Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 1998; 16(1):144-150.
- [78] Levander G. A study of bone regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1938; 67:705-714.
- [79] Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends biotechnol* 2001; 19(7):255-65.
- [80] Li S, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L. Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection. *Gene Ther* 1999; 6:585-94.
- [81] Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84(A):1032-1044.
- [82] Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998; 283(Suppl):2-37.
- [83] Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996; 19(1 Suppl):1-12.
- [84] Lippuner K, Golder M, Greiner R. Epidemiology and direct medical costs of osteoporotic fractures in men and women in Switzerland. *Osteoporos Int.* 2005; 16(Suppl 2):8-17.
- [85] Littenberg B, Weinstein LP, McCarren M, Mead T, Swiontkowski MF, Rudicel SA, Heck D. Closed fractures of the tibial shaft. A meta-analysis of three methods of treatment. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80(2):174-183.
- [86] Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003; 32(5):521-31.

- [87] Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(2):197-208.
- [88] Lyon T, Scheele W, Bhandari M, Koval KJ, Sanchez EG, Christensen J, Valentin A, Huard F. Efficacy and safety of recombinant human bone morphogenetic protein 2/calcium phosphate matrix for closed tibial diaphyseal fracture: a double-blind, randomized, controlled phase-II/III trial. *J Bone Joint Surg Am* 2013; 95(23):2088-2096.
- [89] Majola A, Vainionpää S, Vihtonen K, Mero M, Vasenius J, Törmälä P, Rokkanen P. Absorption, biocompatibility and fixation properties of polylactic acid in bone tissue: an experimental study in rats. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 268:260-269.
- [90] Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42(6):551-555.
- [91] Martin E, editor. *Concise medical dictionary*. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
- [92] Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-791.
- [93] McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE((R)) Bone Graft). *Int Orthop* 2007;
- [94] McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 62(2):150-162.
- [95] Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 1999; 24(6):541-547.
- [96] Musculoskeletal injuries report: incidence, risk factors and prevention. American Academy of Orthopedic Surgeons 2000; [researchinfo@aaos.org](mailto:researchinfo@aaos.org)
- [97] Namikawa T, Terai H, Takaoka K. Experimental spinal fusion in a rabbit model with new drug delivery system for BMP. *Clin Calcium* 2006; 16(5):793-800.
- [98] National Trauma Data Bank Report 2002; The American College of Surgeons
- [99] Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). *Bone* 1988; 9(1):67-69.
- [100] Pauly S, Back D, Kaeppler K et al. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13:208.
- [101] Pecina M, Vukicevic S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. *Int Orthop* 2007; 31:719-20.
- [102] Pelinkovic D, Horas U, Engelhardt M, Musahl V, Fu FH, Börner M. Gentherapie in der Knochenheilung. *Trauma Berufskrankh* 2001; 3:278-282.

- [103] Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem* 1994; 269:12918-12924.
- [104] Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Jr., Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 1996; 7:1437-46.
- [105] Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 34:3-19.
- [106] Pritchard J, Ruzicka A. Comparison of fracture repair in the frog, lizard and rat. *J Anat* 1950; 84:236-261.
- [107] Raisz LG, Kream BE. Hormonal control of skeletal growth. *Annu Rev Physiol* 1981; 43:225-238.
- [108] Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone* 2002; 30(1):144-151.
- [109] Reckhenrich AK, Koch C, Egaña JT, Plank C. The use of non-viral gene vectors for bioactive Poly-(D,L-Lactide) implant surfaces in bone tissue engineering. *Eur Cells and Mat* 2012; 23:441-448.
- [110] Rose T, Peng H, Usas A, Kuroda R, Lill H, Fu FH, Huard J. Gene therapy to improve osteogenesis in bone lesions with severe soft tissue damage. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388(5):356-365.
- [111] Rürger R. Methoden der Genübertragung. Ganten D, Ruckpaul K. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 1 Molekular- und zellbiologische Grundlagen*. Berlin und Heidelberg: Springer Verlag, 1997:197-241.
- [112] Rüter A, Trentz O, Wagner M. Kompartmentsyndrom. *Unfallchirurgie*. München-Wien-Baltimore: Springer Verlag, 1995:18-21.
- [113] Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993; 289:292-312.
- [114] Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, Gänsbacher B. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 2002; 9:102-109. (A)
- [115] Scherer F, Schillinger U, Putz U, Stemberger A, Plank C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 2002; 4:634-43. (B)
- [116] Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(5):469-84.

- [117] Schillinger U, Wexel G, Hacker C, et al. A fibrin glue composition as carrier for nucleic Acid vectors. *Pharm Res* 2008; 25:2946-62.
- [118] Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001; 28(4):341-350. (A)
- [119] Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly (D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res Applied Biomat* 2001; 58(4): 449-455. (B)
- [120] Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. BMP-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodelling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002; 30(6):816-822. (A)
- [121] Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gäbelein T, Flyvbjerg A, Bail H, Raschke M. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1. *Bone* 2002; 31(1):165-172. (B)
- [122] Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn TA, Haas NP, Raschke M. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma* 2004; 1:35-42.
- [123] Schwabe P, Greiner S, Ganzert R, Eberhart J, Dähn K, Stemberger A, Plank C, Schmidmaier G, Wildemann B. Effect of a novel nonviral gene delivery of BMP-2 on bone healing. *Scientific World Journal* 2012; 2012:560142.
- [124] Seeherman H, Bouxsein ML, Kim H, Li R, Li XJ, Aiolova M, Wozney J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(9):1961-1972.
- [125] Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Faerman A, Shoshani T, Barenholz Y. The role of organ vascularization and lipoplex-serum initial contact in intravenous murine lipofection. *J Biol Chem* 2003; 278:39858-65.
- [126] Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88(6):701-705.
- [127] Sørensen TS, Sørensen AI, Merser Rapid release of gentamycin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand* 1990; 61(4):353-6.
- [128] Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998; 22(6):410-416.
- [129] Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulation. *Nat Rev Genet* 2000; 1(2):91-99.

- [130] Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, Kregor PJ, Nordsletten L, Paiement G, Patel A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(6):1258-1265.
- [131] The Bone and Joint Decade 2010-2020. Deutsches Netzwerk. [www.boneandjointdecade.de/html/fakten\\_fragen.html](http://www.boneandjointdecade.de/html/fakten_fragen.html)
- [132] Universität Heidelberg. Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie 2012. <http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/2012-1/05ortho.html>
- [133] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150(698):893-899.
- [134] Urist MR, McLean FC. Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 1952; 34A:443-476.
- [135] U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recently-approveddevices/ucm081154.htm>
- [136] Vandenberghe LH, Wilson JM. AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* 2007; 7:325-33.
- [137] Welch RD, Jones AL, Buchholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li, XJ. Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 on Fracture Healing in a Goat Tibial Fracture Model. *J Bone Miner Res* 1998; 13(9): 1483-1490
- [138] Wildemann B, Lübberstedt M, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. IGF-1 and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 2004; 25(17):3639-3644.
- [139] Wildemann B, Kadow-Romacker A, Lübberstedt M, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polylactide carrier. *Calcif Tissue Int* 2005; 76:50-55. (A)
- [140] Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stöckle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide) – growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials* 2005; 26(18):4035-4040. (B)
- [141] Wildemann B, Lange K, Strobel C, Fassbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 2011; 42(8):746-752.
- [142] Woo EJ, Adverse events after recombinant human BMP2 in nonspinal orthopaedic procedures. *Clin Orthop Relat Res.* 2013; 471(5):1707-1711.

- [143] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885):1528-1534.
- [144] Wrobel I, Collins D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1235:296-304.
- [145] Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1992; 74(5):659-670.
- [146] Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipids. *J Biol Chem* 1995; 270:18997-19007.
- [147] Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM. What's new in the role of cytokines on osteoblasts proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract* 1992; 188(8):1104-1121.
- [148] Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1189:195-203.

## 9. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Ich, Ricarda Käthner, geb. Ganzert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden mittels non-viralen Vektors zur Stimulation der Frakturheilung – eine histologische Untersuchung am Rattenmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den 20.09.2014

Ricarda Käthner

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ricarda Käthner, geb. Ganzert hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

P Schwabe, S Greiner, **R Ganzert**, J Eberhardt, K Dähn, A Stemberger, C Plank, G Schmidmaier, B Wildemann. Effect of a novel non viral gene delivery of BMP-2 on bone healing. The Scientific World Journal Vol. 2012, 2012:560142.

Beitrag im Einzelnen: Anteil an anästhesiologischer/operativer, radiologischer und histologischer Methodik, Nachsorgeuntersuchungen, Erarbeitung der histologischen und radiologischen Ergebnisse.

Publikation 2:

Schwabe P, Wildemann B, Stemberger A, Plank C, **Ganzert R**, Eberhardt J, Dähn K, Haas NP, Schmidmaier G. Non-viraler Gentransfer von BMP-2 Plasmiden mit einem Copolymer Protected Gene Vector (COPROG) inkorporiert in eine Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung zur Beschleunigung der Frakturheilung. Meeting Abstract (EF17-539) Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Unfallchirurgie und 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie und Unfallchirurgie 22.-25.10.2008 Berlin

Beitrag im Einzelnen: Anteil an anästhesiologischer/operativer, radiologischer und histologischer Methodik, Nachsorgeuntersuchungen, Erarbeitung der histologischen und radiologischen Ergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## **10. Lebenslauf**

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

## 11. Anhang

### 11.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Absorbable Collagen Sponge
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
COPROG	Copolymer protected gene
CPM	Counts per minute
CPM	Calcium phosphate matrix
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
FDA	Food and Drug Administration
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NPC	Nuclear Pore Complex
p.-a.	posterior-anterior
PCL	Poly- $\epsilon$ -Caprolacton
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
PLA	polylactic acid
PROCOP	protective copolymer
PTH	Parathormon
rh	recombinant human
ROI	Region of Interest
SOC	Standard of care
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
WF	Wachstumsfaktor
ZOL	Zoledronat

## 11.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Phasen der Knochenheilung (nach Baillon-Plaza et al.)
- Abb. 2 Schematische Darstellung der BMP-Signaltransduktion
- Abb. 3 Schematische Darstellung der Gentherapie-Prinzipien
- Abb. 4 Schematische Darstellung eines Copolymer-protected gene vectors
- Abb. 5 Zellulärer Mechanismus der DNA-Aufnahme
- Abb. 6 Darstellung der Operationsschritte
- Abb. 7 Histologische Färbung Safranin O/Lichtgrün
- Abb. 8 Histologische Färbung nach von Kossa
- Abb. 9 Ausschnitt aus dem Bildanalyseprogramm Zeiss KS 400
- Abb. 10 Definition der periostalen Kallusfläche
- Abb. 11 Bestimmung der Baseline
- Abb. 12 Safranin O/Lichtgrün-Färbung
- Abb. 13 Radiologische Aufnahmen der Kontrollgruppe im Verlauf
- Abb. 14 Radiologische Aufnahmen aller Gruppen nach 42 Tagen
- Abb. 15 Exemplarische Schnittpräparate der untersuchten Gruppen 28d postoperativ
- Abb. 16 Exemplarische Schnittpräparate der untersuchten Gruppen 42d postoperativ
- Abb. 17 Detailaufnahmen von Geweben
- Abb. 18 Maximales Drehmoment nach 42 Tagen

### 11.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf [modifiziert nach Solheim 1998]
Tab. 2	Vergleich viraler Vektoren [Bonadio 1998; Pelinkovic 2001]
Tab. 3	Gruppeneinteilung und Versuchsplan
Tab. 4	Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung der Präparate
Tab. 5	Verabreichungsschema des Polymerisationssystems Technovit® 9100 NEU
Tab. 6	Röntgen-Score 28d postoperativ
Tab. 7	Röntgen-Score 42d postoperativ
Tab. 8	Histomorphometrische Ergebnisse der Baseline (Tibiadurchmesser)
Tab. 9	Histomorphometrische Ergebnisse der Kortikalis
Tab. 10	Histomorphometrische Ergebnisse der Ausdehnung des periostalen Kallus
Tab. 11	Histomorphometrische Ergebnisse der mineralisierten Anteile periostal
Tab. 12	Histomorphometrische Ergebnisse der knorpeligen Anteile

## 11.4. Publikationen

Teile dieser Promotionsarbeit wurden in folgenden Artikeln oder Kongressbeiträgen publiziert:

P Schwabe, S Greiner, **R Ganzert**, J Eberhardt, K Dähn, A Stemberger, C Plank, G Schmidmaier, B Wildemann. Effect of a novel non viral gene delivery of BMP-2 on bone healing. The Scientific World Journal Vol. 2012, 2012:560142.

Schwabe P, Wildemann B, Stemberger A, Plank C, **Ganzert R**, Eberhardt J, Dähn K, Haas NP, Schmidmaier G. Non-viraler Gentransfer von BMP-2 Plasmiden mit einem Copolymer Protected Gene Vector (COPROG) inkorporiert in eine Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung zur Beschleunigung der Frakturheilung. Meeting Abstract (EF17-539) Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Unfallchirurgie und 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie und Unfallchirurgie 22.-25-10.2008 Berlin

## 12. Danksagung

Ich bedanke mich bei dem Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, *Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert P. Haas*, sowie bei *Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda* aus dem Julius Wolff Institut in deren Abteilungen ich meine Promotionsarbeit durchführen durfte.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier* sowie meiner Doktormutter *Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann* für die Unterstützung in der Durchführung dieses Themas.

Meinem Betreuer *Herrn Dr. med. Philipp Schwabe* danke ich für die Zusammenarbeit im operativen Teil der Arbeit.

Des Weiteren danke ich *Frau Gabriele Hardung*, *Frau Camilla Bergmann* und *Martin Wollny* für die freundliche und hilfsbereite Einarbeitung im Labor.

*Frau Jana Eberhart* und *Frau Kerstin Jungen* danke ich ganz herzlich für die Inangriffnahme dieser Arbeit und die aufmunternden und kreativen Worte in so manch abendlicher Stunde unserer Diskussionsrunden.