

Aus dem **Julius Wolff Institut**
der **Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin**
am Campus Virchow Klinikum

DISSERTATION

**„Sequentielle Freisetzung von Wirksubstanzen aus einer
Implantatbeschichtung zur Behandlung von Knochendefekten“**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicarum

(Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Catrin Strobel

aus Hannover

GUTACHTER:

1. Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann
2. Priv.-Doz. Dr. med. Martin Lucke
3. Priv.-Doz. Dr. med. Gerald Zimmermann

TAG DER PROMOTION: 07. September 2012

ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONEN

ABSTRAKT	1
EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	2
METHODEN	
Polymerbeschichtung von Titan-Kirschnerdrähten.....	3
Untersuchung der grundsätzlichen Funktionalität beschichteter Nägel <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	3
Beispiel 1: Wachstumsfaktor BMP-2 (Publikation Nr. 1)	
Beispiel 2: Angiogenese Inhibitoren (Publikation Nr. 2)	
Charakterisierung der PDLLA-Beschichtung, Untersuchung und Modifizierung der Freisetzungsmechanismen aus der Implantatbeschichtung (Publikation Nr. 3).....	3
Sequentielle Freisetzung von zwei, beziehungsweise drei verschiedenen Wirksubstanzen aus der PDLLA-Beschichtung (Publikation Nr. 4).....	5
Automatisierung der Beschichtung (Publikation Nr. 5).....	6
ERGEBNISSE	
Grundsätzliche Funktionalität beschichteter Nägel <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	7
Beispiel 1: Wachstumsfaktor BMP-2 (Publikation Nr. 1)	
Beispiel 2: Angiogenese Inhibitoren (Publikation Nr. 2)	
Charakterisierung der PDLLA-Beschichtung und Modifizierung der Freisetzungsmechanismen (Publikation Nr. 3).....	7
Sequentielle Freisetzung von zwei, beziehungsweise drei verschiedenen Wirksubstanzen aus der PDLLA-Beschichtung (Publikation Nr. 4).....	9
Automatisierung der Beschichtung (Publikation Nr. 5).....	12
DISKUSSION	13
LITERATUR	16
ANTEILSERKLÄRUNG	18
AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN	20
LEBENS LAUF	25
PUBLIKATIONS LISTE	26
KONGRESSBEITRÄGE & PREISE	28
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	31
DANKSAGUNG	32

Die Funktionalisierung von orthopädischen Implantaten zur Nutzung als sogenannte lokale „Drug Delivery Systems“ ist ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von Frakturheilungsstörungen, welcher in dieser Arbeit näher charakterisiert und modifiziert wird. Bei gestörter oder ganz ausbleibender Heilung von Knochenfrakturen kann eine lokale und zeitlich kontrollierte Applikation von mehreren Wachstumsfaktoren die Knochenheilung durch die Simulation natürlicher Prozesse effektiv stimulieren. Zusätzlich könnte eine initiale Gabe von Antibiotika das Infektionsrisiko senken.

In den beiden hier aufgeführten *in vivo* Studien konnte jeweils gezeigt werden, dass die Beschichtung von Implantatoberflächen mit dem Polymer Poly(*D,L*-Laktid) (PDLLA) als Trägermaterial und verschiedenen Wirksubstanzen [Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) und Fumagillin] den Knochenheilungsverlauf positiv, aber auch negativ beeinflussen können. Die lokale Applikation des Wachstumsfaktors BMP-2 führte im Gegensatz zur Kontrolle zu einer Heilung der osteotomierten Rattentibia. Die zweite Studie diente der Etablierung eines Tiermodells zur verzögerten Knochenheilung. Die lokale Gabe des Angiogenesehemmers Fumagillin bewirkte die Inhibition der Gefäßbildung und so die Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose (Nicht-Heilung). Dieses Pseudarthrose-Modell in der Ratte kann zukünftig zur näheren Untersuchung von gestörter Knochenheilung dienen.

Zur detaillierten Charakterisierung dieses lokalen Freisetzungssystems wurde für die Beschichtung von Titan-Kirschnerdrähten die Polymerkonzentration und die Menge der eingearbeiteten Modellsubstanz Gentamicin variiert. Neben Schichtdickenvermessung, Bestimmung der Beschichtungsmenge und Beurteilung der Morphologie wurden die Nägel zur Messung der Freisetzungskinetiken in Phosphatpuffer eluiert. Eine höhere Polymerkonzentration führte zu deutlich höheren Viskositäten und somit zu dickeren Schichten. Mit ansteigender Polymerkonzentration und sich verringerndem Gentamicinanteil waren unterschiedliche kumulative Freisetzungen messbar, von sofortiger Initialfreisetzung bis zur langsamen und kontinuierlichen Freisetzung über 14 Wochen. Die Ursache liegt in verschiedenen Freisetzungsmechanismen die in einander übergreifen. Zuerst erfolgt eine schnelle Diffusion der hydrophilen, oberflächennahen Partikel. Zeitgleich beginnt die Degradation des hydrophoben Polymers. In wässriger Umgebung entstehen durch Hydrolyse mit der Zeit Mikrokanälchen, welche zu einer langsamen Freisetzung der Wirksubstanz führen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden 2- bzw. 3fach-kombinierte Nägel [Gentamicin und BMP-2, bzw. Gentamicin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) und BMP-2] in unterschiedlich dicken Schichten mit entsprechend unterschiedlichen Anteilen an Wirksubstanzen im Sandwichverfahren beschichtet, eluiert und zusätzlich die Aktivitäten der freigesetzten Substanzen mikrobiologisch und in Zellkulturen untersucht. Vom 2fach-kombinierten Nagel ergab sich eine initiale Freisetzung von Gentamicin, gefolgt von einer langsamen Freisetzung von BMP-2 über zwei Wochen. Vom 3fach-kombinierten Nagel wurde nach schneller Antibiotikumsfreigabe auch IGF-I zügig freigegeben und anschließend fortgesetzt. BMP-2 wurde von Beginn an langsam und kontinuierlich über mehrere Wochen freigesetzt. Mit Mausmyoblasten (C2C12) konnten diese zeitverzögerten Freisetzungseffekte über die Messung der Proliferation und Alkalischen Phosphatase Aktivität bestätigt werden. In humanen, primären Osteoblasten war ein additiver Effekt der kombiniert beschichteten Nägel auf diese Parameter, im Vergleich zu Kontrollnägeln, messbar.

Durch die Automatisierung des Beschichtungsprozesses konnten die einzelnen Schritte der Tauchbeschichtung (Mischen, Eintauchen, Verweildauer, Austausch) operatorunabhängig gesteuert, kontrolliert und näher untersucht werden. Von maßgeblichem Einfluss auf die aufgebrauchte Polymer-Wirkstoffmenge war die Austauschgeschwindigkeit und Viskosität der Polymerlösung. Der Automat ermöglicht vordefinierte und standardisierte Beschichtungen von Implantaten.

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* einsetzbares und funktionelles „Drug Release System“ für Implantate untersucht und weiterentwickelt. Mit nur einem Polymer ist es möglich, durch Nutzung der charakterisierten Freisetzungsmechanismen unterschiedliche Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten vom Implantat freizugeben. Die zeitlich versetzten Aktivitäten der Wachstumsfaktoren imitieren die natürliche Abfolge von regulierenden Faktoren während der aufeinanderfolgenden Heilungsphasen. Zusätzlich wurde eine Apparatur entwickelt, mit der standardisierte Beschichtungen durchführbar sind. Die sequentielle Freisetzung eines Antibiotikums und zweier Wachstumsfaktoren aus einer Ein-Komponenten-Implantatbeschichtung bietet das Potential zur lokalen Therapie von gestörter Knochenheilung.

Im Vergleich zu anderen Geweben und Organen hat Knochen eine besondere Eigenschaft. Nach einer Fraktur hat Knochengewebe das Potential, sich ohne Narbenbildung vollständig zu regenerieren. Doch neben dieser Einzigartigkeit kann es zu verzögerter oder gar ganz ausbleibender Heilung (Pseudarthrose) kommen [1]. Für eine optimale Knochenheilung ist das Diamant-Konzept bekannt, welches die vier Eckpfeiler des Heilungsverlaufes beschreibt: die mechanische Stabilität, osteoinduktive Wachstumsfaktoren, osteogene Zellen und osteokonduktive Strukturen [2]. Hieran knüpft die Idee, stabilisierende Implantate zu funktionalisieren und als lokales „Drug Delivery System“ (DDS) einzusetzen [3]. Neben der mechanischen Stabilisierung ist das Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren auf osteogene Zellen während der verschiedenen Heilungsphasen (Inflammation, Kallusbildung, Knochenumbau) von großer Bedeutung. Eine große Rolle spielen hierbei zum Beispiel „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „insulin-like growth factors“ (IGF) oder „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) [4, 5] (Abb. 1). Um diese natürlichen Vorgänge nachzubilden, liegt es nahe, bei gestörter Heilung Wachstumsfaktoren gezielt so zu applizieren, dass diese zu verschiedenen Zeitpunkten die aufeinanderfolgenden Heilungsphasen lokal stimulieren und begleiten können.

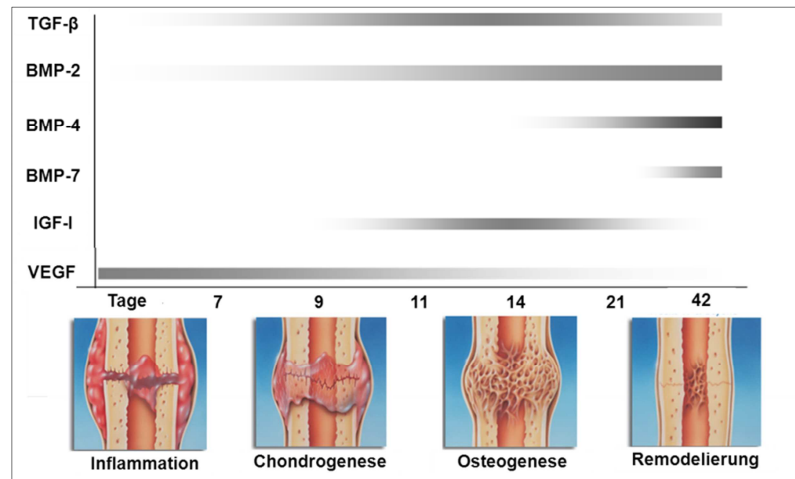


Abb. 1: Expressionen von Wachstumsfaktoren zu den verschiedenen Phasen der Knochenheilung (Quellen: modifiziert aus Lienau et al. JOR 2009, Tissue Eng 2010, www.medical-definitions.com)

Das Prinzip des DDS konnte bereits mit einem Antibiotikum gezeigt werden, welches trotz gestörter Blutversorgung, im Vergleich zur systemischen Gabe, unmittelbar am Frakturort wirken und so Infektionen effektiv vorbeugen konnte [6]. Zur Nutzung der Implantate als lokalen Wirkstofflieferanten, kann für eine Beschichtung zum Beispiel das amorphe Polymer Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) verwendet werden, in welches sich Substanzen zur Freigabe einarbeiten lassen [7] (Abb. 2). Das biodegradierbare PDLLA ist ein gut verträgliches Trägermaterial [8], das bereits in der Klinik als Träger für Antibiotika auf Implantaten Anwendung findet [9].

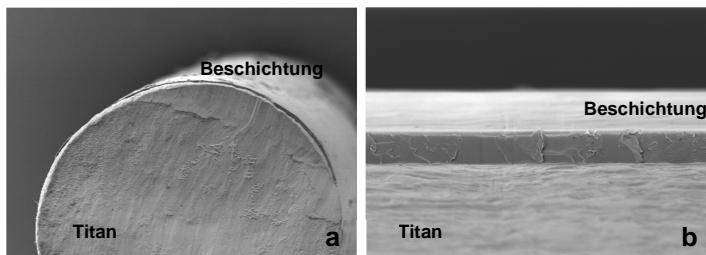


Abb. 2: Die Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen mit PDLLA beschichteten Titan-Kirschnerdraht (1mm Ø) a) im Querschnitt (100x) b) Detailaufnahme der Beschichtung (2000x) (Quelle: modifiziert aus Schmidmaier et al. Injury 2008)

ZIELSETZUNG

Ziel dieses Promotionsprojektes war die Entwicklung einer Implantatbeschichtung, basierend auf nur einem Polymer, PDLLA, zur sequentiellen lokalen Applikation verschiedener Substanzen (Antibiotikum und Wachstumsfaktoren). Hierzu gehörte, zunächst die grundsätzliche Funktionalität dieses Systems mit unterschiedlichen Wirkstoffen *in vivo* zu bestätigen, die Charakterisierung des verwendeten Polymers als Beschichtung und die Untersuchung der Freisetzungsmechanismen. Im Folgenden sollten unterschiedliche Kinetiken, wie etwa eine initiale oder verzögerte Freisetzung, als Peak oder langanhaltend gleichförmige Freisetzung der verschiedenen Wirksubstanzen kombiniert werden. Hierzu sollten die freigesetzten Substanzen quantifiziert und deren Aktivitäten *in vitro* untersucht werden. Eine weitere Aufgabe war die Entwicklung und Evaluierung eines automatisierten Beschichtungsverfahrens.

POLYMERBESCHICHTUNG VON TITAN KIRSCHNERDRÄHTEN

Das Polymer PDLLA (Resomer 203 S, mittleres Molekulargewicht 18.000 - 28.000 Dalton, Glasübergangstemperatur 46-50°C, Boehringer Ingelheim) wurde je nach Versuch zu unterschiedlichen Anteilen im Lösungsmittel Ethylazetat (Sigma Life Science) gelöst und steril filtriert (Minisart, PTFE, 0,20 µm, Sartorius). Die jeweilige Wirksubstanz wurde in der gewünschten Zielkonzentration [% w/v] in die Polymerlösung eingebracht. Durch zweifaches Eintauchen der Kirschnerdrähte (K-Drähte, Ø 1 mm, Synthes) in diese Suspension wurde die Beschichtung unter sterilen Bedingungen manuell aufgebracht (Tauchbeschichtung). Die Nägel wurden anschließend über Nacht getrocknet, steril verpackt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

UNTERSUCHUNG DER GRUNDSÄTZLICHEN FUNKTIONALITÄT BESCHICHTETER NÄGEL *IN VITRO* UND *IN VIVO*

BEISPIEL 1: WACHSTUMSFAKTOR BMP-2 (PUBLIKATION NR. 1)

Es wurden K-Drähte mit PDLLA (100 mg/1,5 ml Ethylazetat) und 5% w/w BMP-2 (Osteogenetics) beschichtet, auf die Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 gegeben und so die Aktivität des freigesetzten BMP-2 überprüft. Nach 3 Tagen Inkubation wurde die Proliferation mit Hilfe von Alamar Blue (Biozol) und die Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP, Sigma Life Science) photometrisch gemessen. Zusätzlich wurde ALP gefärbt (n=9).

Weiter wurden die BMP-2-beschichteten K-Drähte zur Stabilisierung in einem Tibia-Osteotomiemodell in Ratten verwendet und der Heilungsverlauf radiologisch, histologisch und biomechanisch im Vergleich zu Kontrollgruppen (PDLLA-beschichtete Nägel ohne BMP-2) ausgewertet (n=6 pro Gruppe und Zeitpunkt). Statistik: Mann-Whitney U-Test. (Durchführung: Katharina Lange und Mirja Fassbender).

BEISPIEL 2: ANGIOGENESE-INHIBITOREN (PUBLIKATION NR. 2)

Zur Auswahl eines geeigneten Angiogenese-Inhibitors zur Etablierung eines atrophischen Pseudarthrosemodells in der Ratte, wurden zur Reduktion der Tieranzahl im sich anschließenden Tierversuch vier Substanzen in verschiedenen Konzentrationen *in vitro* getestet. In die PDLLA Beschichtung der K-Drähte (100 mg/1,5 ml Ethylazetat) wurden jeweils 5, 10 und 20% w/w der antiangiogenen Substanzen Artesunate (Sigma Life Science), Fumagillin (Enzo Life Science), SU5416 (Sigma Life Science) und 3,5,4'-Trimethoxystilbene (Biomol GmbH) eingearbeitet und die Nägel mit Endothelzellen (HMEC-1) und primären humanen Osteoblasten (pOB) kultiviert. Die Proliferationsrate wurde nach 3 und 6 Tagen mit Alamar Blue gemessen (n=12). Statistik: Globaler Vergleich aller Gruppen Kruskal-Wallis (p<0,001). Vergleich von zwei Gruppen Mann-Whitney U-Test und Bonferroni-Holm-Methode.

Im Anschluss wurden daraus zwei Substanzen ausgewählt (Artesunate und Fumagillin) und deren Einfluss auf die Gefäßneubildung im HET-CAM-Test näher untersucht (n=6, Durchführung: Camilla Bergmann). Letztendlich wurde 10% w/w Fumagillin für die Beschichtung der K-Drähte im Tibia-Osteotomiemodell der Ratte eingesetzt und der Heilungsverlauf radiologisch, histologisch und biomechanisch untersucht (Fumagillingruppe: n=8 pro Zeitpunkt, PDLLA-Kontrollgruppe: n=6 pro Zeitpunkt. Statistik: Mann-Whitney U-Test. (Durchführung: Juliane Rauhe und Mirja Fassbender).

CHARAKTERISIERUNG DER PDLLA-BESCHICHTUNG, UNTERSUCHUNG UND MODIFIZIERUNG DER FREISETZUNGSMECHANISMEN AUS DER IMPLANTATBESCHICHTUNG (PUBLIKATION NR. 3)

BESCHICHTUNG

Zur Modifizierung der Freisetzung wurden die Anteile der drei Komponenten der Beschichtung (Polymer, Lösungsmittel und Wirksubstanz) variiert. Die Ausgangskonzentration der Polymerlösung war 100 mg PDLLA in 1,5 ml Ethylazetat (1x). Im Folgenden wurden die Anteile des PDLLA erhöht bei gleichbleibendem Volumen des Ethylazetats: 200 mg/1,5 ml (2x), 300 mg/1,5 ml (3x) und 400 mg/1,5 ml

(4x). Als Modellsubstanz wurde das gemahlene Antibiotikum Gentamicinsulfat (Fujian Fukang Phamaceuticals) verwendet.

Gruppe 1 (PDLLA konstant, Gentamicin ansteigend [% w/w]): Hier wurde 1x PDLLA mit steigendem Anteil Gentamicin verwendet (10% w/w, 17% w/w und 24% w/w). Zusätzlich wurden Nägel mit 10% w/w Gentamicinanteil mit einer weiteren Schicht substanzfreiem PDLLA überzogen, einmal mit 2x PDLLA und weitere Nägel mit 3x PDLLA (je n=3).

Gruppe 2 (PDLLA ansteigend, Gentamicinmenge konstant [% w/w]): In dieser Gruppe wurden Nägel mit 1x, 2x, 3x und 4x PDLLA beschichtet, in die jeweils 10% w/w Gentamicin eingearbeitet war. Das heißt die absoluten Gentamicinmengen in den jeweiligen Lösungen erhöhten sich (je n=6).

Gruppe 3 (PDLLA ansteigend, Gentamicin abfallend [% w/w]): Es wurden ebenfalls Nägel mit 1x, 2x, 3x und 4x PDLLA beschichtet, in die jeweils dieselbe Absolutmenge an Gentamicin eingebracht wurde. Diese führte je nach PDLLA-Anteil zu sinkenden Gentamicinkonzentrationen von 10% w/w, 6% w/w, 4% w/w, 3% w/w (je n=6).

GESAMTBESCHICHTUNGSMENGE UND SCHICHTDICKE

Zur Bestimmung der Gesamtbeschichtungsmenge wurden die Nägel vor und nach der Beschichtung gewogen (Feinwaage Precisa XR205SM-DR, Precisa Gravitmetrics AG). Die Schichtdicke wurde mit Hilfe einer digitalen Bügelmessschraube (0-25 mm / 0.001 mm, Messfläche Ø 6 mm, Mitutoyo) vermessen (je n=4).

MORPHOLOGIE

Die Nagelbeschichtungen der Gruppen 1 und 3 (je n=3) wurden unter Vakuum goldbesputtert (MED 020, Bal-Tec) und durch Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM, DSM 982 Gemini, Zeiss) visualisiert. Dazu wurden die Polymerschichten teilweise artifiziell beschädigt, um diese zusätzlich zur Aufsicht auch im Querschnitt darstellen und bewerten zu können.

MECHANISCHE STABILITÄT

Die mechanische Stabilität der Beschichtung auf den Nägeln (Gruppe 3) wurde durch Biegebelastung untersucht. Dazu wurden die Nägel horizontal an einem Ende fixiert und das entgegengesetzte Ende kontrolliert in einem definierten Abstand mit einer Materialprüfmaschine (LM1 Test Bench, Bose; Wintest 4.1 software) herunter gedrückt. Im Anschluss wurden die Nägel auf eventuell entstandene Risse in der Beschichtung mittels REM untersucht.

ELUTIONSVERSUCHE

Für die Untersuchung der Elution wurden die Nägel vollständig mit Phosphatpuffer (PBS) und 1% Bovines Serum Albumin (BSA) bedeckt (5 ml) und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4h, 1d, 3d, 7d, 14d, 21d, 28d, 35d wurden 0,5 ml Probe entnommen und jeweils durch frischen PBS-Puffer ersetzt (n=6). Die Nägel der Gruppen 2 und 3 wurden im Wiederholungsversuch bis zu 32 Wochen eluiert (n=3).

Die Quantifizierung des Gentamicins wurde mit KIMS (kinetic interaction of microparticles in solution) im Zentrallabor der Charité durchgeführt und daraus die kumulative Freisetzungskinetik berechnet.

BESTIMMUNG DER GENTAMICINMENGE IN DER BESCHICHTUNG

Zwecks Quantifizierung des Gentamicins in der Beschichtung vor (n=4) und nach Elution (n=3) wurden die beschichteten Nägel in Ethylazetat gespült. Das darin enthaltene Gentamicin wurde durch Flüssig-Flüssig-Extraktion in destilliertes Wasser überführt und darin analysiert.

MIKROBIOLOGISCHE AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNG DES FREIGESETZTEN GENTAMICINS

Zur Bestimmung der Aktivität wurden die Eluatproben, welche während der Elutionsversuche entnommen worden waren, im Hemmhoftest untersucht (je n=3). Dazu wurde der Keim *Staphylococcus aureus* auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert und die Eluate auf darauf platzierte Filterplättchen gegeben. Nach Übernachtinkubation bei 37°C wurden die Hemmhöfe dokumentiert und vermessen.

SEQUENTIELLE FREISETZUNG VON ZWEI, BEZIEHUNGSWEISE DREI VERSCHIEDENEN WIRKSUBSTANZEN AUS DER PDLLA-BESCHICHTUNG (PUBLIKATION NR. 4)

BESCHICHTUNG

Zur Untersuchung der sequentiellen Freisetzung wurden zwei (Gentamicin und BMP-2), bzw. drei Substanzen (Gentamicin, BMP-2 und IGF-I) kombiniert auf die Nägel aufgebracht. Hierbei sollte das Antibiotikum unmittelbar und die Wachstumsfaktoren unterschiedlich verzögert freigegeben werden.

Gruppe 1: Als erste Schicht wurde 3x PDLLA mit 3% w/w inkorporierten BMP-2 (Wyeth) auf die Nägel aufgebracht und im zweiten Schritt 1x PDLLA mit 10% w/w Gentamicin (2fach kombinierter Nagel).

Gruppe 2: Hier wurden die Nägel ebenfalls zuerst in 3x PDLLA mit 3% w/w BMP-2 getaucht, im Anschluss in 2x PDLLA mit 3% w/w IGF-I (R&D Systems) und als dritte Schicht in 0,5x PDLLA mit 10% w/w Gentamicin (3fach kombinierter Nagel).

Für die Zellkulturversuche wurden als Kontrollen Nägel mit der jeweils einzelnen Substanz in der entsprechenden Polymerkonzentration und substanzfrei nur mit PDLLA beschichtet.

ELUTIONSVERSUCHE

Wie im vorausgehenden Kapitel (Seite 4) beschrieben, wurden die Nägel in PBS + 1% BSA eluiert und die verschiedenen Substanzen darin über die Zeit analysiert (n=6). Die Wachstumsfaktoren wurden durch Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA, R&D Systems) quantifiziert. Zusätzlich wurde ein Teil der Nägel aus der Gruppe 2 in Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) eluiert.

AKTIVITÄTSUNTERSUCHUNGEN DER FREIGESETZTEN SUBSTANZEN *IN VITRO*

Das freigesetzte Antibiotikum wurde, wie oben beschrieben, mikrobiologisch im Hemmhoftest untersucht (n=6).

Die Aktivitäten der freigesetzten Wachstumsfaktoren wurden mit Hilfe von Zellkulturen getestet, mit der Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 und humanen, primären Osteoblasten (pOB) (je n=6). Nach Aussaat und Adhärenz der jeweiligen Zellen wurden die beschichteten Nägel der beiden Gruppen mit Hilfe von Transwell-Einsätzen (Nunc) auf den Zellen platziert. Zusätzlich wurden als Kontrollen Nägel mit der jeweiligen Einzelsubstanz im Polymer und dem reinen PDLLA beschichtet und ebenfalls kultiviert. Nach 3 Tagen wurden die Einsätze mit den Nägeln entfernt und nacheinander die Proliferation mittels Alamar Blue (Biozol) und die Alkalische Phosphatase Aktivität photometrisch bestimmt. Die Einsätze mit den Nägeln wurden erneut auf jeweils frisch ausgesäte Zellen gesetzt und nach 4 Tagen wieder die Proliferation und ALP bestimmt. Im weiteren Verlauf wurde dieses Verfahren wöchentlich über 8 Wochen mit jeweiligem halben Mediumwechsel 3 Tage nach Aussaat fortgesetzt.

AUTOMATISIERUNG DER BESCHICHTUNG (PUBLIKATION NR. 5)

Zur Standardisierung der bislang manuell durchgeführten Beschichtungen wurde in Zusammenarbeit mit TOWICON (Bad Wildungen) ein Beschichtungsautomat entwickelt und gebaut (Abb. 3). Herzstück des Automaten sind zwei Achsen, welche von drei Schrittmotoren über eine Steuereinheit angesteuert werden können. Die untere Achse fixiert die Beschichtungsgefäße, welche durch Rotation die Beschichtungssuspension mischt. In die obere Achse werden Nägel eingespannt und können zum Tauchen nach unten und oben bewegt oder zum Trocknen rotiert werden. Mit diesem Automaten lassen sich Mischvorgang, Eintauchgeschwindigkeit, Verweildauer, Austauschgeschwindigkeit sowie der Trocknungsvorgang ansteuern und kontrollieren. Ausgehend von einem Basisprogramm wurde der Einfluss dieser Parameter mit verschiedenen Polymer- und Substanzkonzentrationen (Gentamicin) näher untersucht und jeweils die Beschichtungsmengen und Schichtdicken bestimmt ($n=6$).

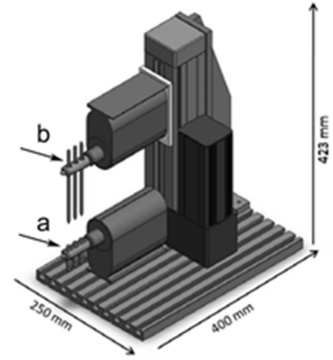


Abb. 3: Technische Zeichnung des Beschichtungsautomaten

a) Rotationsarm mit Beschichtungsgefäßen b) Rotations- und Hebearm mit Nägeln (Quelle: Towicon)

GRUNDSÄTZLICHE FUNKTIONALITÄT BESCHICHTETER NÄGEL *IN VITRO* UND *IN VIVO*

BEISPIEL 1: WACHSTUMSFAKTOR BMP-2 (PUBLIKATION NR. 1)

Der osteogene Effekt des freigesetzten BMP-2 aus beschichteten Nägeln konnte *in vitro* gezeigt werden. Die Aktivität des osteogenen Markers ALP der C2C12-Zellen, welche mit BMP-2 stimuliert wurden, war deutlich erhöht im Vergleich zur kaum vorhandenen Aktivität in den Titannagel- und Polymerkontrollen. Dies wurde durch die ALP-Färbung bestätigt.

In vivo konnte im etablierten hypertrophen Tibia-Pseudarthrose-Modell der Ratte nachgewiesen werden, dass die intramedulär eingebrachten, mit BMP-2 beschichteten Titannägel, zu einer signifikanten Steigerung der mechanischen Stabilität der Knochen im Vergleich zu den Kontrollgruppen führte. Nach 84 Tagen waren die osteotomierten Tibiae der BMP-2-Gruppe vollständig überbrückt, wohingegen der Heilungsverlauf in den Kontrolltieren verzögert war und es zu keiner Überbrückung des Spaltes kam.

BEISPIEL 2: ANGIOGENESE-INHIBITOREN (PUBLIKATION NR. 2)

Der Proliferationsverlauf der HMEC-1 Zellen über 6 Tage, welche mit den vier zu testenden Anti-Angiogenen Substanzen in den Beschichtungen inkubiert wurden, zeigte konzentrationsabhängige Hemmungen für Artesunate, 3,5,4'-Trimethoxystilbene und insbesondere Fumagillin. SU5416 führte zu keinem inhibierenden Effekt der Endothelzellproliferation.

Die Inkubation auf Osteoblasten führte bei allen Substanzen im Vergleich zur Polymerkontrolle zu leicht inhibierenden Proliferationseffekten. Am wenigsten ausgeprägt war die Hemmung durch Fumagillin und am deutlichsten bei den mit 3,5,4'-Trimethoxystilbene getesteten Zellen.

In ovo zeigte in PDLLA eingearbeitetes Fumagillin (10% w/w) eine Hemmung der Gefäßneubildung im angebrüteten Hühnerei, wohingegen die mit Artesunate (10% w/w) inkubierten Embryonen abstarben.

Im sich darauf anschließendem Ratten-Tierversuch wurde 10% w/w Fumagillin in die Beschichtung eingearbeitet und als Kontrolle nur das Polymer zur Beschichtung verwendet. Alle Tiere zeigten nach intramedulärer Stabilisierung der Tibia-Osteotomie einen verzögerten Heilungsverlauf, wobei die Fumagillin-Gruppe im Vergleich zur PDLLA-Kontrolle signifikant weniger Blutgefäße im frühen Kallusstadium ausbildeten und signifikant weniger Kallus über 84 Tage entwickelte. Dies ist ein typisches Merkmal für die Ausbildung einer atrophischen Pseudarthrose.

CHARAKTERISIERUNG DER PDLLA-BESCHICHTUNG UND MODIFIZIERUNG DER FREISETZUNGSMECHANISMEN (PUBLIKATION NR. 3)

CHARAKTERISIERUNG DER POLYMERBESCHICHTUNG

Auf den REM-Bildern war die Beschichtung auf den Nägeln (1x PDLLA) als glatte und homogene Oberfläche zu erkennen.

Im Vergleich zur Beschichtung aus einfach konzentriertem PDLLA stieg die aufgebrachte Beschichtungsmenge von 0,3 mg/cm² auf die 5-fache Menge bei doppelter PDLLA-Konzentration bis hoch zur 17-fachen Menge bei 4x PDLLA mit höchster Gentamicinkonzentration.

Dieser Verlauf wird von den jeweiligen Schichtdicken bestätigt, beginnend mit 4 µm für die geringste eingesetzte PDLLA-Konzentration bis zu 47 µm für die höchste Polymer- und Gentamicinkonzentration.

Die Testung der mechanischen Stabilität unter Biegebelastung zeigte im REM über die Länge der Nägel keine Beschädigung in der Beschichtung. Erst bei extremer manueller Biegung über 90° riss die Beschichtung auf.

KUMULATIVE ELUTIONSKINETIKEN

In den drei unterschiedlich beschichteten Gruppen wurden in Abhängigkeit der verwendeten Polymerkonzentration und der eingearbeiteten Menge an Gentamicin über 5 Wochen verschiedene

Freisetzungen gemessen (Abb. 4). In der Langzeitelution über 32 Wochen der Gruppen 2 und 3 waren die Kinetiken nicht wesentlich verändert, jedoch stiegen in der letzten Phase zwischen der 28. und 32. Woche die freigesetzten Mengen noch einmal leicht an. Die mit 3x und 4x PDLLA beschichteten Nägel aus der Gruppe 3 setzten die langsame Freisetzung kontinuierlich bis etwa zur 20. Woche fort.

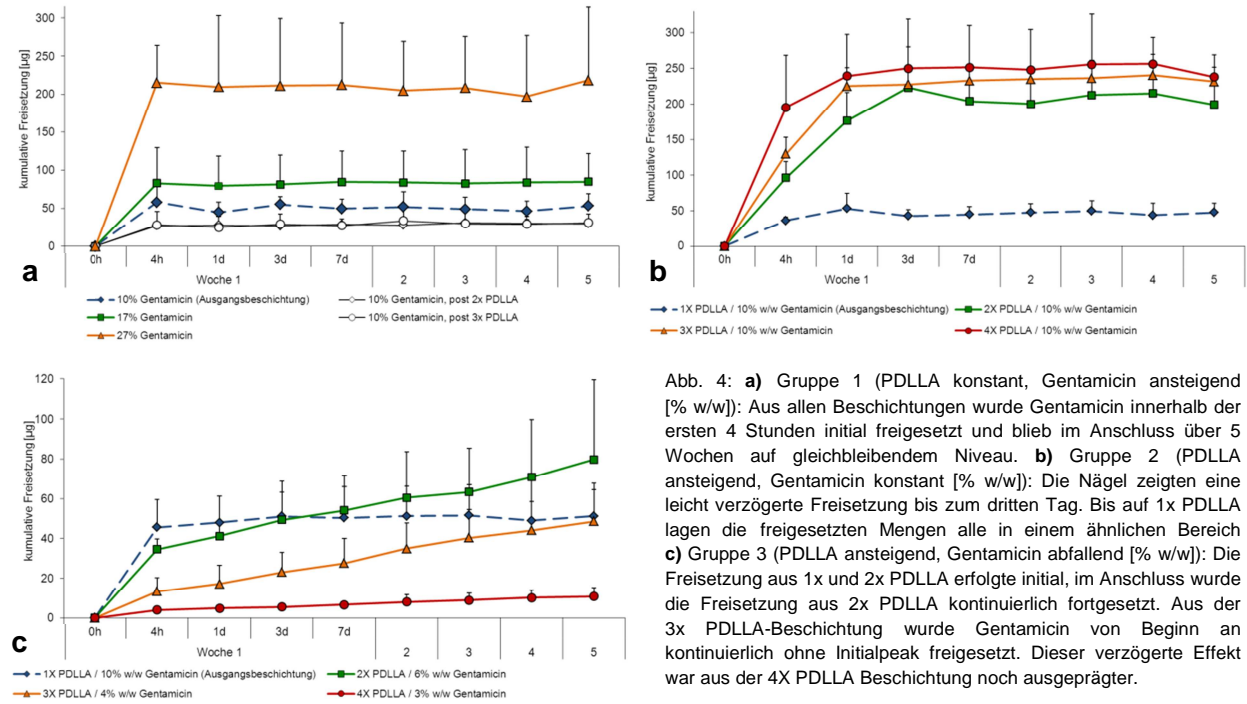


Abb. 4: **a**) Gruppe 1 (PDLLA konstant, Gentamicin ansteigend [% w/w]): Aus allen Beschichtungen wurde Gentamicin innerhalb der ersten 4 Stunden initial freigesetzt und blieb im Anschluss über 5 Wochen auf gleichbleibendem Niveau. **b**) Gruppe 2 (PDLLA ansteigend, Gentamicin konstant [% w/w]): Die Nägel zeigten eine leicht verzögerte Freisetzung bis zum dritten Tag. Bis auf 1x PDLLA lagen die freigesetzten Mengen alle in einem ähnlichen Bereich **c**) Gruppe 3 (PDLLA ansteigend, Gentamicin abfallend [% w/w]): Die Freisetzung aus 1x und 2x PDLLA erfolgte initial, im Anschluss wurde die Freisetzung aus 1x und 2x PDLLA kontinuierlich fortgesetzt. Aus der 3x PDLLA-Beschichtung wurde Gentamicin von Beginn an kontinuierlich ohne Initialpeak freigesetzt. Dieser verzögerte Effekt war aus der 4x PDLLA Beschichtung noch ausgeprägter.

GENTAMICINMENGE IN DER BESCHICHTUNG VOR UND NACH LANGZEITELUTION (GRUPPE 2 UND 3)

Aus 1x PDLLA wurde Gentamicin nach 32 Wochen nahezu vollständig freigesetzt (99%). Am wenigsten wurde aus der höchsten PDLLA-Konzentration (4x) freigesetzt, 29% Gentamicin verblieben auf dem Nagel.

MIKROBIOLOGISCHE AKTIVITÄT DES FREIGESETZTEN GENTAMICINS (GRUPPE 3)

Das Wachstum der Hemmhöfe aus den direkt entnommenen Eluatproben spiegelte die Freisetzungsläufe von Gruppe 3 wider (Abb. 5).

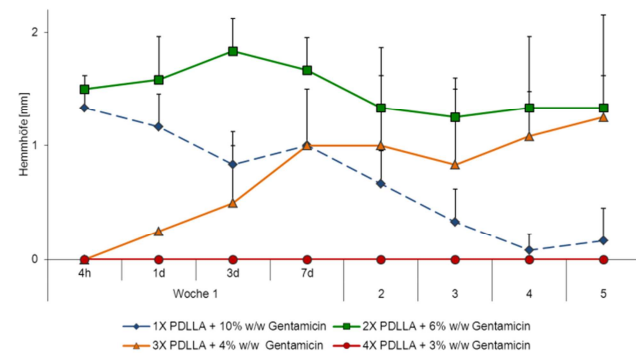


Abb. 5: Die Hemmhof-Durchmesser der 4h-Eluatproben aus der 1x und 2x PDLLA-Beschichtung waren sehr ähnlich, wobei im weiteren Verlauf die Hemmhöfe aus der 1x PDLLA-Beschichtung kleiner wurden und aus der 2x PDLLA-Beschichtung etwa gleich blieben. Aus den 3x PDLLA-Beschichtungen waren erst aus 1d-Proben kleine Hemmhöfe sichtbar, die im Verlauf bis zur Eluatprobe aus der 1. Woche stetig größer wurden. Aus den Eluatproben der 4x PDLLA Beschichtung entstanden aufgrund der geringen Gentamicinkonzentrationen keine Hemmhöfe.

SEQUENTIELLE FREISETZUNG VON ZWEI, BEZIEHUNGSWEISE DREI VERSCHIEDENEN WIRKSUBSTANZEN AUS DER PDLLA-BESCHICHTUNG (PUBLIKATION NR. 4)

KUMULATIVE ELUTIONSKINETIKEN DER KOMBINIERT BESCHICHTETEN NÄGEL

Aus den 2fach-kombiniert beschichteten Nägeln (Gentamicin und BMP-2) wurde etwa die Hälfte des Gentamicins nach etwa einem Tag freigesetzt und die Konzentration im Eluat stieg weiter leicht über die weiteren 8 Wochen der Freisetzung an. Von denselben Nägeln wurde knapp die Hälfte des BMP-2 langsam und kontinuierlich über zwei Wochen freigesetzt.

Aus den 3fach-kombiniert beschichteten Nägeln wurden Gentamicin, IGF-I und BMP-2 unterschiedlich freigesetzt (Abb. 6). Die Elution der 3fach-kombiniert beschichteten Nägel in serumhaltiges Zellkulturmedium zeigte jeweils dieselben Kinetiken wie in PBS (schnelle Freisetzung von Gentamicin und IGF-I mit anschließend fortgesetzter Freisetzung von IGF-I und langsamer Freisetzung von BMP-2), jedoch waren die kumulativ freigesetzten Mengen bei IGF-I und BMP-2 zwei- bis dreifach höher.

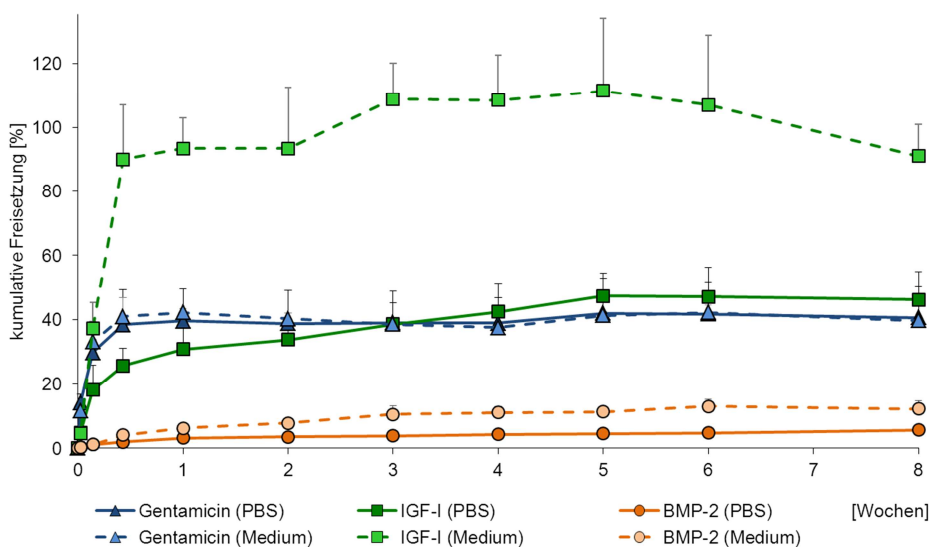


Abb. 6: Elution in PBS (durchgezogene Linien): Gentamicin und IGF-I wurden innerhalb der ersten drei Tage freigegeben, Gentamicin verblieb auf diesem Niveau und IGF-I wurde bis zur 5. Woche fortgesetzt freigesetzt. BMP-2 wurde langsam und kontinuierlich freigesetzt.

Elution in Medium (gestrichelte Linien): Die drei Substanzen zeigten jeweils sehr ähnliche Kinetiken im Vergleich zur Elution in PBS, jedoch IGF-I und BMP-2 mit zwei- bis dreifach höheren Mengen.

MIKROBIOLOGISCHE AKTIVITÄT DES FREIGESETZTEN GENTAMICINS (GRUPPE 1)

Die Hemmhöfe der Eluate der 2fach-kombiniert beschichteten Nägel (Gentamicin und BMP-2) aus 4h und 1d waren 16 und 20 mm groß. Aus den sich anschließenden Eluatproben bis zur 8. Woche wurden die Hemmhöfe langsam kleiner. Der Verlauf der Hemmhöfe aus den Kontrollnägeln (nur mit Gentamicin beschichtet) war vergleichbar, jedoch die Höfe etwas kleiner.

Aus den Elutionsproben der 3fach-kombiniert beschichteten Gruppe waren keine Hemmhöfe sichtbar, da die aufgebrauchte Gentamicinmenge durch die halbierte Polymerkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag.

AKTIVITÄT DES FREIGESETZTEN BMP-2 (GRUPPE 1)

Die metabolische Aktivität der C2C12-Zellen, welche mit 2fach-kombiniert beschichteten Nägeln (Gentamicin und BMP-2) kultiviert wurden, stieg verzögert innerhalb der ersten zwei Wochen an, vergleichbar der Kontrollgruppe nur mit BMP-2 beschichteten Nägeln. Ein ähnlicher Effekt war bei der ALP-Aktivität der Zellen vorhanden (Abb. 7).

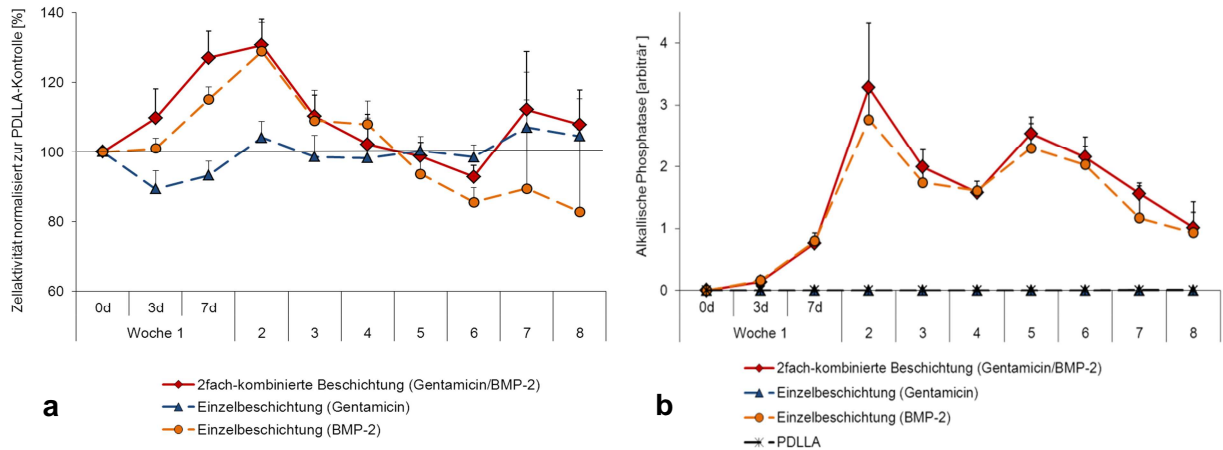


Abb. 7: **a)** Im Vergleich zur Polymer-Kontrolle stieg die metabolische Aktivität der C2C12-Zellen (2fach-kombiniert beschichtete Nägel und BMP-2 Kontrollnägel) innerhalb der ersten zwei Wochen um ein Drittel an, um im Anschluss wieder abzufallen. Die Zellen, welche mit der Gentamicin-Kontrolle kultiviert wurden, zeigten Anfangs eine Reduktion der Aktivität. **b)** Die ALP der Zellen mit den kombiniert beschichteten Nägeln und mit BMP-2 Kontrollen stieg deutlich bis zur zweiten Woche an. Zellen, die mit Gentamicin und ausschließlich Polymer beschichteten Nägeln kultiviert wurden, zeigten keine ALP.

AKTIVITÄT DES FREIGESETZTEN IGF-I UND BMP-2 (GRUPPE 2)

Die metabolische und ALP-Aktivität der C2C12-Zellen, welche mit 3fach-kombiniert beschichteten Nägeln (Gentamicin, IGF-I und BMP-2) und mit der IGF-I Kontrolle kultiviert wurden, stiegen im Vergleich zur Polymer-Kontrolle bis zur zweiten Woche an (Abb. 8).

Die Kultivierung mit pOBs zeigte durch die Inkubation mit kombiniert beschichteten Nägeln eine kontinuierlich ansteigende metabolische Aktivität und ALP bis zur zweiten Woche. Die mit Gentamicin kultivierten Zellen zeigten zu Anfang einen leichten Abfall der Aktivität im Vergleich zur Polymerkontrolle, diese glich sich nach einer Woche wieder an (Abb. 9).

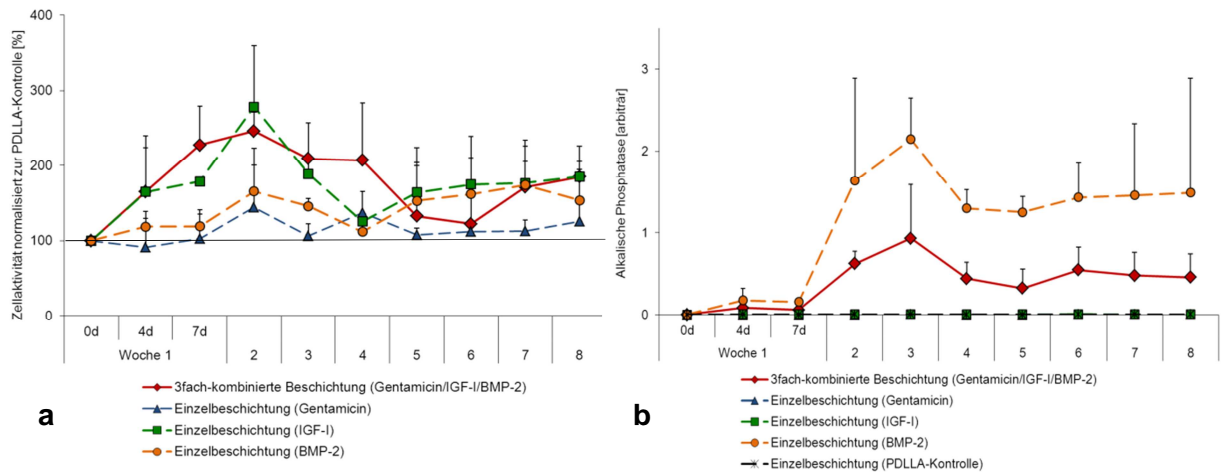


Abb. 8: **a)** Die metabolische Aktivität der C2C12-Zellen, welche mit kombiniert beschichteten Nägeln und mit der IGF-I Kontrolle kultiviert wurden, stiegen im Vergleich zur Polymer-Kontrolle bis zur zweiten Woche an. Eine leichte Aktivität der Zellen wurde auch bei BMP-2 und Gentamicin-beschichteten Kontrollnägel detektiert. **b)** Die ALP der Zellen, welche mit den kombiniert beschichteten Nägel und mit BMP-2-Nägeln inkubiert wurden, stieg während der zweiten Woche an. Die IGF-I, Gentamicin und nur mit PDLLA beschichteten Nägeln induzierten keine ALP.

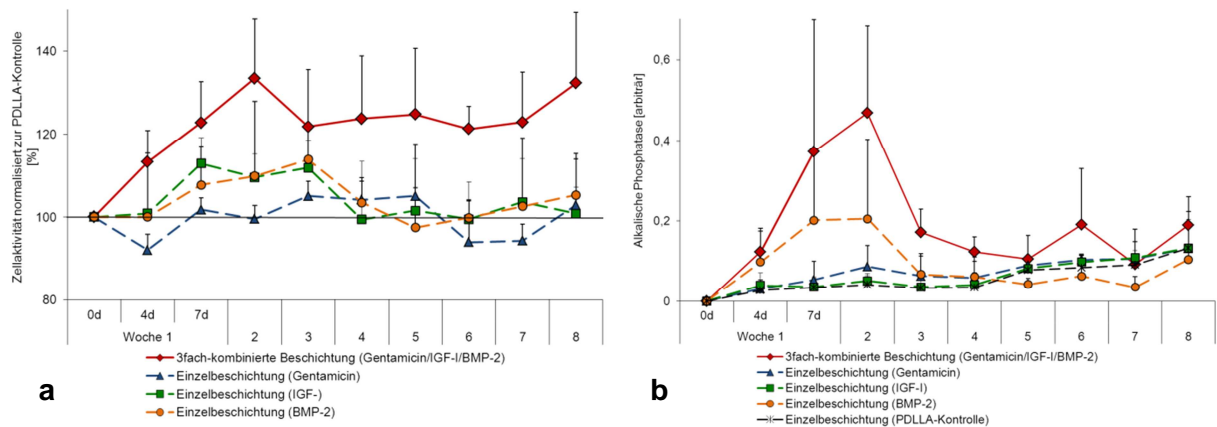
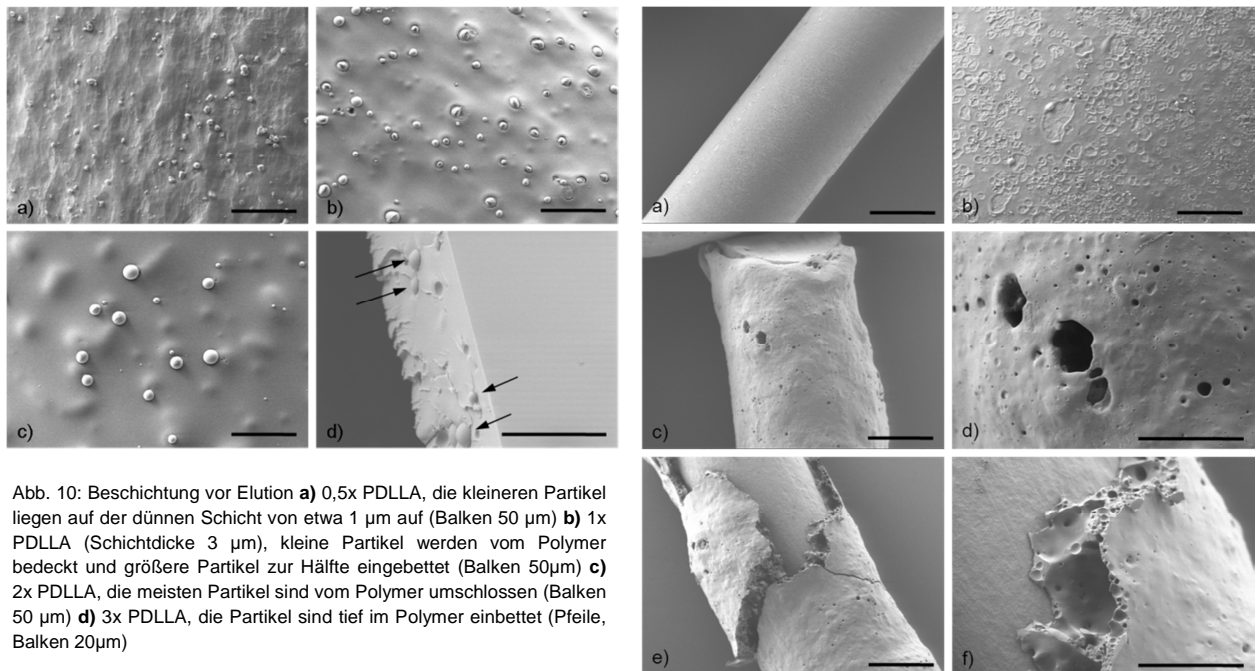


Abb. 9: **a)** Durch die Inkubation mit 3fach-kombiniert beschichteten Nägeln zeigten die pOBs eine kontinuierlich ansteigende metabolische Aktivität bis zur zweiten Woche. Bei den Kontrollnägeln mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor stieg die Aktivität zu Beginn der Kultur leicht bis zur zweiten Woche an. **b)** Die ALP der pOBs, welche mit den kombiniert beschichteten Nägeln und den BMP-2-Kontrollnägeln behandelt wurden, stieg bis zur zweiten Woche an, wobei die ALP der kombiniert behandelten Zellen etwa doppelt so hoch war.

MORPHOLOGIE DER BESCHICHTUNGEN AUF DEN NÄGELN VOR UND NACH ZELLKULTUR-ELUTION

Die REM-Aufnahmen der Beschichtungen vor Elution zeigten die inkorporierten Gentamicinpartikel in Abhängigkeit der verwendeten Polymerkonzentrationen (Abb. 10). Nach Inkubation in der Zellkultur wurde in den REM-Aufnahmen die Degradation der Beschichtung sichtbar (Abb. 11).



AUTOMATISIERUNG DER BESCHICHTUNG (PUBLIKATION NR. 5)

EINFLUSS DER BESCHICHTUNGSPARAMETER

Mischen der Beschichtungslösung: Abhängig vom Mischmodus wurden geringe Unterschiede in der Beschichtungsdicke und der Gentamicinkonzentration gemessen. Jedoch unabhängig davon stieg die Dicke und die eingearbeitete Menge an Gentamicin leicht von der Spitze zur gegenüberliegenden Seite über die Länge des Nagels an.

Eintauchgeschwindigkeit der Nägel in die Beschichtungslösung: Wurde die Eintauchgeschwindigkeit im Vergleich zum Basisprogram um die Hälfte verringert oder erhöht, führte dies jeweils zu leicht geringeren Beschichtungsdicken um 1 bis 2 μm .

Verweildauer der Nägel in der Beschichtungslösung: Die Variierung der Verweildauer hatte fast keinen Effekt auf die Beschichtungsmenge und Dicke.

Austauschgeschwindigkeit aus der Beschichtungslösung: Die Austauschgeschwindigkeit zeigte einen deutlichen Effekt auf die Beschichtungsmenge und Dicke. Je schneller die Nägel austauchten, desto mehr Polymer verblieb auf den Nägeln.

Einfluss der Polymerlösungen: Durch die Veränderung der Polymerkonzentration im Lösungsmittel verändert sich die Viskosität der Polymerlösungen. Eine hohe Polymerkonzentration erhöhte die Viskosität deutlich und führte somit zu einer größeren Menge Polymer und Gentamicin auf einem Nagel.

Die lokale Applikation von Wirkstoffen ist im Fokus vieler Anwendungen, da die systemische Gabe von Therapeutika für den gesamten Organismus belastend sein kann. Daher ist die Nutzung von orthopädischen und traumatologischen Implantaten als lokale Wirkstofflieferanten zur Behandlung von gestörten Frakturheilungen ein vielversprechender Ansatz.

In den hier aufgeführten *in vivo* Studien (Publikation Nr. 1 und 2) konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von Implantatoberflächen mit dem Polymer PDLLA als Trägermaterial für verschiedene Wirksubstanzen (BMP-2 und Fumagillin) den Heilungsverlauf beeinflussen kann. Im Osteotomie-Modell der Ratte waren im Unterschied zur Kontrollgruppe (substanzfrei-beschichtete PDLLA-Nägel) die mit BMP-2-beschichteten Nägeln versorgten Tibia vollständig überbrückt [10, 11]. Des Weiteren wurden bei der Untersuchung verschiedener anti-angiogener Substanzen nach Freisetzung aus der Beschichtung unterschiedliche Effekte auf Endothelzellen *in vitro* gemessen. Fumagillin und Artesunate zeigten *in vitro*, in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration im Vergleich zu den anderen Substanzen, eine deutlich inhibierende Wirkung auf die Endothelzellen und nur einen geringen Einfluss auf Osteoblasten. Im nachfolgenden *in ovo* Test führte Fumagillin zur Gefäßinhibition, Artesunate jedoch zu einem unerwünschten Absterben der Hühnerembryonen. Daraus schlussfolgernd wurde zur Hemmung der Gefäßbildung während der Heilung Fumagillin zur Implantatbeschichtung ausgewählt. In diesem Osteotomie-Modell wurde durch Fumagillin die zur Heilung notwendige Angiogenese nachteilig beeinflusst, was zu einer reduzierten Kallusbildung führte und so eine atrophe Pseudarthrose erzeugte. In anderen Studien werden verzögerte Heilungen durch massive mechanische Manipulationen, Zerstörung des Periosts oder systemischen Gabe von anti-angiogenen Substanzen erzeugt [12, 13]. Dieses Pseudarthrose-Modell in der Ratte ähnelt durch die lokale Hemmung der Angiogenese am ehesten der Pathologie humaner atropher Pseudarthrosen und scheint daher für zukünftige Untersuchungen und Entwicklungen neuer Therapien zur Behandlung von verzögerter Heilung geeignet.

Zur näheren Charakterisierung der verwendeten PDLLA-Beschichtung wurden verschiedenen Konzentrationen dieses Polymers mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Gentamicin als Modellsubstanz eingesetzt (Publikation Nr. 3). Die Testung der mechanischen Stabilität zeigte eine gute mechanische Robustheit der Beschichtungen, welche die Untersuchungen des PDLLA-Abriebs von Schmidmaier et al und Gollwitzer et al bestätigen [8, 14]. Für den späteren klinischen Einsatz ist die Stabilität der Beschichtung entscheidend. In den Elutionsversuchen konnten in den verschiedenen Ansätzen deutlich unterschiedliche Freisetzungskinetiken gezeigt werden. Wurde 1x PDLLA mit ansteigenden Gentamicinkonzentrationen eingesetzt (Gruppe 1), kam es jeweils zu einer sehr schnellen initialen Freisetzung des Antibiotikums innerhalb der ersten Stunden. Wurde der Anteil PDLLA, bei gleichbleibendem prozentualen Gentamicinanteil erhöht (Gruppe 2), kam es zu einer leicht verzögerten Freisetzung innerhalb der ersten drei Tage. In der dritten Gruppe, in der die Nägel mit ansteigenden PDLLA-Konzentrationen und geringer werdenden Gentamicin-Konzentrationen beschichtet waren, konnten deutlich veränderte Freisetzungskinetiken mit ausgeprägter Verzögerung über viele Wochen beobachtet werden. Dies konnte zusätzlich im mikrobiologischen Hemmhoftest bestätigt werden. Ursache dieses Effektes liegt unter anderem in den unterschiedlichen Eigenschaften des Polymers (hydrophob) und Gentamicins (hydrophil) in Kombination mit verschiedenen Schichtdicken. Je höher die eingesetzte PDLLA-Konzentration war, desto viskoser verhielten sich die Polymerlösungen. Dies führte zu deutlich ansteigenden Schichtdicken und damit auch zu unterschiedlich ausgeprägter Einbettung der eingebrachten Gentamicinpartikel. Gentamicin, welches in Ethylazetat unlöslich ist, wird als Partikel in der Polymermatrix eingekapselt. Befindet sich diese Gentamicin-Polymerbeschichtung in wässriger Umgebung, diffundiert oberflächennahes hydrophiles Gentamicin in Richtung wässriger Phase, während zur selben Zeit Wasser durch hydrolytische Degradation die hydrophobe Matrixbarriere durchdringt. Diese beiden Vorgänge laufen zeitgleich ab und werden maßgeblich durch die Menge der eingeschlossenen Partikel und die Schichtdicke beeinflusst. Sind sehr viele Partikel eingeschlossen kommt es trotzdem zu einer zügigen Freisetzung, da sich verhältnismäßig viele Partikel in der Nähe oder auf der Oberfläche befinden und somit die Diffusionsstrecken kurz sind. Es bilden sich Kanäle im Polymer, die eine schnelle Freisetzung begünstigen. Dieser Effekt wird als osmotisch induzierter Diffusions-Kanal-Mechanismus beschrieben [15]. In der zweiten untersuchten Gruppe (PDLLA ansteigend, Gentamicinmenge konstant) wird dieser Mechanismus noch deutlicher, da die Schichtdicken

stark variieren. Bei Schichtdicken bis zu 50 µm waren Partikel teilweise tiefer eingebettet, so dass die frühe Freisetzung sich von wenigen Stunden (Gruppe 1) auf ein bis drei Tage verlängerte. In der dritten Gruppe (PDLLA ansteigend, Gentamicin abfallend) wurden ähnliche Schichtdicken wie in Gruppe 2 erreicht, jedoch mit sich verringernder Menge von Gentamicinpartikeln. Die daraus entstehende langsame und konstante Freisetzung wird durch anfängliche osmotische Konvektion geleitet, die in eine Freisetzung durch langsame Degradation des Polymers übergeht [16]. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Freisetzung über mehrere Mechanismen gesteuert wird: Diffusion, Schwellung, Degradation und Erosion [17]. Bei der langsamen Freisetzung aus dickeren PDLLA-Schichten bedeutet dies konkret, dass dieses Polymer das Eindringen von Wasser zwar ermöglicht, aber die tief eingekapselten Partikel kaum freigibt. Dies führt über die Zeit zu einem ansteigenden osmotischen Druck innerhalb des Polymers, was letztendlich zum Aufbrechen der Polymermatrix und damit zum finalen Freisetzen der Substanzen führt. Dies erklärt die ansteigende Freisetzung am Ende der Langzeit-Elution, wenn die Degradation des langsam erodierenden Polymers fortschreitet. Die Degradation der dickeren Schichten war jedoch in den gezeigten Versuchen noch nicht abgeschlossen, da noch verbleibendes Gentamicin auf den Nägeln mit hoch konzentriertem PDLLA gemessen wurde.

Aus den Erkenntnissen dieser Studie wurden verschiedene Substanzen in Kombination im Sandwich-Verfahren (Gentamicin mit BMP-2; Gentamicin, IGF-I und BMP-2) auf Nägel aufgebracht und Elutionsversuche zur Freisetzung durchgeführt (Publikation Nr. 4). REM-Aufnahmen von beschichteten Nägeln, die vor und nach Inkubation in der Zellkultur aufgenommen wurden, zeigen auf der Oberfläche Poren, aus denen sich die Freisetzungskanäle ins Innere bilden und sich durch die gesamte Schicht ziehen. Nach 10-wöchiger Inkubation *in vitro* sind die Poren, Kanälchen und Mikrorisse deutlich zu erkennen. Hier drang die wässrige Umgebung ein und die dann gelösten Substanzen diffundierten heraus. Von beiden kombiniert beschichteten Nägeln wurde jeweils Gentamicin aus der äußersten Schicht aufgrund der sehr kurzen Diffusionsstrecke und dem unmittelbaren Kontakt mit der wässrigen Umgebung sehr schnell initial freigegeben. Vom 2fach-kombinierten Nagel wurde das tiefer im Polymer eingebettete BMP-2, welches zusätzlich mit der dünneren PDLLA/Gentamicinschicht überzogen war, verlangsamt über zwei Wochen freigegeben. Auch beim 3fach-kombiniert beschichteten Nagel konnte dieser Sandwicheffekt, kombiniert mit dickeren Polymerschichten für unterschiedliche Freisetzungskinetiken genutzt werden [18, 19]. Auch IGF-I, welches unter der sehr dünnen Gentamicinschicht aus 0,5x PDLLA die Mittelschicht bildete, wurde vorerst zügig freigesetzt. Im Anschluss erfolgte dann eine fortgesetzte Freisetzung aus der dickeren Polymerschicht aus doppelt konzentriertem PDLLA. BMP-2, welches in der untersten und dicksten PDLLA-Schicht eingebettet war, wurde von Beginn an langsam und kontinuierlich durch Degradation freigegeben.

Auch die Elutionsumgebung kann Einfluss auf das Freisetzungsverhalten haben. Bei der Elution in Zellkulturmedium blieben die Kinetiken im Vergleich zu PBS gleich, aber die freigesetzten Mengen waren deutlich erhöht. Hierbei kann, bedingt durch ein anderes Puffersystem, ein herabgesetzter pH-Wert im Vergleich zu PBS eine Rolle spielen, welcher hier jedoch nicht gemessen worden war [20]. Da eine pH-Verschiebung in der sehr frühen inflammatorischen Phase der Heilung bekannt ist [21], ist dieser Effekt *in vivo* durchaus zu berücksichtigen. Ein weiterer Einfluss kann durch das Serum bedingt sein. Serum kann elektrostatische Bindungen zwischen Polymer und Protein senken [22] oder Ionenkonzentrationen verändern, welche Einfluss auf das Schwellverhalten des Polymers haben kann [23]. Letztendlich macht die mechanische, zelluläre und metabolische *in vivo* Umgebung weitere *in vivo* Untersuchungen unerlässlich.

Die Aktivität des freigesetzten Gentamicins von 2fach-kombiniert beschichteten Nägeln wurde hier ebenfalls durch deutliche Hemmhofbildung aus den frühen Elutionsproben mikrobiologisch bestätigt. Diese frühe Gentamicin-Aktivität in unmittelbarer Implantatumgebung kann die bakterielle Besiedelung von Implantatoberflächen verhindern, die Infektprophylaxe verbessern und Nebenwirkungen reduzieren [24], da bei systemischer Gabe der Wirkort bei gestörter Vaskularisierung gegebenenfalls nicht erreicht werden kann [6]. Freigesetztes BMP-2 aus kombinierten Nägeln steigerte die metabolische Aktivität und ALP von C2C12-Zellen über 2 Wochen kontinuierlich im Vergleich zur Polymerkontrolle und bestätigte so die verzögerte BMP-2-Freisetzung der Elutionsversuche in PBS. Die 3fach-kombiniert beschichteten Nägel steigerten die Proliferation der Zellen ebenfalls über zwei Wochen, vergleichbar mit den

IGF-I-Kontrollnägeln. Die ALP erreichte erst nach drei Wochen ihren Höhepunkt, ähnlich der BMP-2-Kontrollnägeln. Dies zeigte klar die zeitversetzte Wirksamkeit der sequentiell freigegebenen Wachstumsfaktoren. Bei der Kultivierung mit Osteoblasten wurden die metabolische Aktivität und die ALP jeweils nach zwei Wochen am höchsten stimuliert im Vergleich zu den Kontrollen mit Einzelsubstanzen. Dies sind Hinweise auf additive Effekte durch die kombinierte, sequentielle Anwendung von Wachstumsfaktoren. Außerdem konnte die anfänglich leichte Inhibierung des Zellwachstums durch Gentamicin kompensiert werden.

Nach all den hier durchgeführten Tauchbeschichtungen sollten durch die Automatisierung des Prozesses die verschiedenen Schritte der Beschichtung kontrolliert und standardisiert werden (Publikation Nr. 5). Dabei zeigte sich, dass die Schritte des Mischens, Eintauchens und die Verweilzeit nur geringfügig Einfluss auf die Beschichtung haben. Den größten Effekt auf die Beschichtungsdicke und somit auch die aufgebrauchte Wirkstoffmenge war die Austauschgeschwindigkeit. In einer anderen Studie von Fang et al wird dieser Effekt durch die in Konkurrenz zu einander stehende Gravität und Zugkraft erklärt [33]. Als weiterer Punkt wurde der Einfluss der unterschiedlichen Viskositäten der PDLLA-Lösung in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen auf die Schichtdicken bestätigt. Mit diesem Beschichtungsautomaten war es möglich, die einzelnen Schritte näher zu charakterisieren und zu beschreiben. Der Automat ist operatorunabhängig und erlaubt klar definierte und reproduzierbare Beschichtungen von Implantaten.

Die kombinierte und zeitlich versetzte Applikation von Wachstumsfaktoren hat Potential als Behandlungsstrategie von verzögerter und gestörter Knochenheilung. In den ersten zwei Wochen der Heilung stimuliert IGF-I die Chondrogenese und die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen. Neben der Knorpelbildung induziert BMP-2 auch die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und begleitet den gesamten Heilungsprozess [4, 25, 26]. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine verzögerte lokale Gabe von BMP-2 vorteilhaft ist [27, 28] ebenso wie die lokale Anwendung von IGF-I [29]. Jedoch benötigen andere, auch sequentielle, Freisetzungssysteme mehrere Komponenten zur Umsetzung [30, 31]. In dieser Arbeit konnte unter Verwendung eines einzigen Polymers die lokale Verfügbarkeit von IGF-I während der ersten zwei Wochen, mit dem Übergang in die langanhaltende Applikation von BMP-2, mit einem schnell verfügbaren Antibiotikum zur Vermeidung von Infektionen kombiniert werden. Grundsätzlich ist es denkbar, dieses Freisetzungssystem mit weiteren Wirkstoffen und den gewünschten Verfügbarkeiten, basierend auf natürlich vorkommenden Prozessen, anzuwenden [32]. Letztendlich muss diese Studie *in vivo*, beispielsweise im Rattenmodell [11], weitergeführt werden, um zu zeigen, dass dieser Ansatz tatsächlich die Knochenheilung unterstützen oder sogar verkürzen kann.

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* einsetzbares und funktionelles „Drug Release System“ für Implantate weiterentwickelt und modifiziert. Zusätzlich wurde eine Apparatur entwickelt mit der standardisierte Beschichtungen durchführbar sind. Mit nur einem Polymer ist es möglich, durch Nutzung der zuvor charakterisierten Freisetzungsmechanismen, unterschiedliche Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten aktiv vom Implantat freizusetzen. So könnte mit diesen funktionalisierten Implantaten ein gestörter Heilungsprozess durch sequentiell freigesetzte Wirksubstanzen effektiv begleitet werden und weitere belastende Interventionen für den Patienten überflüssig gemacht werden.

- [1] C. Zeckey, P. Mommsen, H. Andruszkow, C. Macke, M. Frink, T. Stübig, T. Hüfner, C. Krettek, F. Hildebrand, The aseptic femoral and tibial shaft non-union in healthy patients - an analysis of the health-related quality of life and the socioeconomic outcome., *Open Orthop J*, 5 (2011) 193-197.
- [2] G.M. Calori, P.V. Giannoudis, Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber., *Injury*, (2011).
- [3] G. Schmidmaier, P. Schwabe, C. Strobel, B. Wildemann, Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics, *Injury*, 39 Suppl 2 (2008) S37-S43.
- [4] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury*, 36 (2005) 1392-1404.
- [5] R. Marsell, T.A. Einhorn, The biology of fracture healing., *Injury*, 42 (2011) 551-555.
- [6] M. Lucke, B. Wildemann, S. Sadoni, C. Surke, R. Schiller, A. Stemberger, M. Raschke, N.P. Haas, G. Schmidmaier, Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant related osteomyelitis in a rat model., *Bone*, 36 (2005) 770-778.
- [7] B. Wildemann, P. Bamdad, C. Holmer, N.P. Haas, M. Raschke, G. Schmidmaier, Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats, *Bone*, 34 (2004) 862-868.
- [8] H. Gollwitzer, P. Thomas, P. Diehl, E. Steinhäuser, B. Summer, S. Barnstorf, L. Gerdesmeyer, W. Mittelmeier, A. Stemberger, Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants, *Journal of Orthopaedic Research*, 23 (2005) 802-809.
- [9] T. Fuchs, R. Stange, G. Schmidmaier, M.J. Raschke, The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study., *Arch Orthop Trauma Surg*, (2011).
- [10] R. Marsell, T.A. Einhorn, The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair, *Injury*, 40 Suppl 3 (2009) S4-S7.
- [11] C. Kratzel, C. Bergmann, G. Duda, S. Greiner, G. Schmidmaier, B. Wildemann, Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing, *BMC.Musculoskelet.Disord.*, 9 (2008) 135.
- [12] A.A. Reed, C.J. Joyner, S. Isefuku, H.C. Brownlow, A.H. Simpson, Vascularity in a new model of atrophic nonunion., *J Bone Joint Surg Br*, 85 (2003) 604-610.
- [13] M.R. Hausman, M.B. Schaffler, R.J. Majeska, Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis., *Bone*, 29 (2001) 560-564.
- [14] G. Schmidmaier, B. Wildemann, A. Stemberger, N.P. Haas, M. Raschke, Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors, *J.Biomed.Mater.Res, Applied Biomat.*, 58 (2001) 449-455.
- [15] X. Zhang, K.B. McAuley, M.F.A. Goosen, Towards prediction of release profiles of antibiotics from coated poly(lactide) cylinders, *Journal of Controlled Release*, 34 (1995) 175-179.
- [16] S.N. Rothstein, W.J. Federspiel, S.R. Little, A unified mathematical model for the prediction of controlled release from surface and bulk eroding polymer matrices, *Biomaterials*, 30 (2009) 1657-1664.
- [17] A. Göpferich, *Bioresorbable Polymers as Drug Delivery Systems*, in: G. Walenkamp (Ed.) *Biomaterials in Surgery*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998, pp. 121-127.
- [18] R. Langer, J. Folkman, Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules., *Nature*, 263 (1976) 797-800.
- [19] Y. Yeo, K. Park, Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems., *Arch Pharm Res*, 27 (2004) 1-12.
- [20] G. Jiang, B.H. Woo, F. Kang, J. Singh, P.P. DeLuca, Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres., *J Control Release*, 79 (2002) 137-145.
- [21] P. Kolar, K. Schmidt-Bleek, H. Schell, T. Gaber, D. Toben, G. Schmidmaier, C. Perka, F. Buttgerit, G.N. Duda, The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing., *Tissue Eng Part B Rev*, 16 (2010) 427-434.
- [22] M. Lee, T.T. Chen, M.L. Iruela-Arispe, B.M. Wu, J.C. Dunn, Modulation of protein delivery from modular polymer scaffolds., *Biomaterials*, 28 (2007) 1862-1870.
- [23] M.S. Hora, R.K. Rana, J.H. Nunberg, T.R. Tice, R.M. Gilley, M.E. Hudson, Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres., *Pharm Res*, 7 (1990) 1190-1194.
- [24] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C.R. Arciola, Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use., *Biomaterials*, 31 (2010) 6363-6377.
- [25] E. Solheim, Growth factors in bone, *Int.Orthop.*, 22 (1998) 410-416.
- [26] G.L. Barnes, P.J. Kostenuik, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, Growth factor regulation of fracture repair, *J.Bone Miner.Res.*, 14 (1999) 1805-1815.

- [27] G. Wu, Y. Liu, T. Iizuka, E.B. Hunziker, The effect of a slow mode of BMP-2 delivery on the inflammatory response provoked by bone-defect-filling polymeric scaffolds., *Biomaterials*, 31 (2010) 7485-7493.
- [28] D.H. Kempen, L. Lu, T.E. Hefferan, L.B. Creemers, A. Maran, K.L. Claes, W.J. Dhert, M.J. Yaszemski, Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering., *Biomaterials*, 29 (2008) 3245-3252.
- [29] L. Meinel, E. Zoidis, J. Zapf, P. Hassa, M.O. Hottiger, J.A. Auer, R. Schneider, B. Gander, V. Luginbuehl, R. Bettschart-Wolfisberger, O.E. Illi, H.P. Merkle, B. von Rechenberg, Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation, *Bone*, 33 (2003) 660-672.
- [30] B. De la Riva, E. Sánchez, A. Hernández, R. Reyes, F. Tamimi, E. López-Cabarcos, A. Delgado, C. Evora, Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration., *J Control Release*, 143 (2010) 45-52.
- [31] N.J. Shah, M.L. Macdonald, Y.M. Beben, R.F. Padera, R.E. Samuel, P.T. Hammond, Tunable dual growth factor delivery from polyelectrolyte multilayer films., *Biomaterials*, 32 (2011) 6183-6193.
- [32] D.E. Komatsu, S.J. Warden, The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature., *J Cell Biochem*, 109 (2010) 302-311.
- [33] H. Fang, K. Li, T. Su, T. Yang, J. Chang, P. Li, Dip coating assisted polylactic acid deposition on steel surface: Film thickness affected by drag force and gravity, *Material Letters*, 62 (2008) 3739-3741.

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

PUBLIKATION 1:

Britt Wildemann, Katharina Lange, **Catrin Strobel**, Mirja Fassbender, Bettina Willie, Gerhard Schmidmaier

Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model

Injury, Int. J. Care Injured 42 (2011) 746–752

ANTEIL: 10%

BEITRAG IM EINZELNEN: Beschichtung der *in vitro* und *in vivo* verwendeten Titan-Kirschnerdrähte mit PDLLA und BMP-2. *In vitro* Aktivitäts-Testung der beschichteten BMP-2 auf C2C12 Zellen, Analyse der Proliferation mit Alamar Blue und der Alkalischen Phosphatase, Färbung der Alkalischen Phosphatase.

PUBLIKATION 2:

Mirja Fassbender, **Catrin Strobel**, Juliane S. Rauhe, Camilla Bergmann, Gerhard Schmidmaier und Britt Wildemann

Local Inhibition of Angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model

European Cells and Materials Vol. 22 2011: 1-11

ANTEIL: 20%

BEITRAG IM EINZELNEN: Recherche zur Auswahl von anti-angiogenen Substanzen, Beschichtung der Titan-Kirschnerdrähte mit verschiedenen Substanzen, *in vitro* Testung auf HMEC-1-Zellen und Osteoblasten. Analyse der Proliferation mit Alamar Blue. Statistische Auswertung der *in vitro* Ergebnisse.

PUBLIKATION 3:

Catrin Strobel, Gerhard Schmidmaier, Britt Wildemann

Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer

International Journal of Artificial Organs: 2011; 34 (3): 304-316

ANTEIL: 80%

BEITRAG IM EINZELNEN: Versuchsplanung, Etablierung und Durchführung der Beschichtungen, Vermessung, Wiegung der Beschichtungen, Elutionsversuche, Gentamicin-Analytik, Mikrobiologischer Hemmhoftest, Auswertung. Mitarbeit an REM-Aufnahmen und Testung der mechanischen Stabilität der Beschichtung. Erstellung des Manuskripts.

PUBLIKATION 4:

Catrin Strobel, Nicole Bormann, Anke Kadow-Romacker, Gerhard Schmidmaier und Britt Wildemann
Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2)
substances from a one-component polymeric coating on implants
Journal of Controlled Release; 156 (2011) 37-45

ANTEIL: 70%

BEITRAG IM EINZELNEN: Versuchsplanung, Durchführung der Vermessung, Wiegung der Beschichtungen,
mikrobiologischer Hemmhoftest, Etablierung und Durchführung der BMP-2 und IGF-I ELISA, Auswertung,
Erstellung des Manuskripts.

PUBLIKATION 5:

Catrin Strobel, Anke Kadow-Romacker, Tom Witascheck, Gerhard Schmidmaier, Britt Wildemann
Evaluation of process parameter of an automated dip-coating
Materials Letters; 65 (2011) 3621-3624

ANTEIL: 40%

BEITRAG IM EINZELNEN: Erstellung des Lastenheftes und Mitarbeit an dem Entwurf zu einem
Beschichtungsautomaten und dessen Inbetriebnahme, Mitarbeit am Versuchsdesign, der Auswertung
sowie an dem Manuskript.

Catrin Strobel
(Promovendin)

Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann
(Doktormutter)

PUBLIKATION 1

Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model

Britt Wildemann, Katharina Lange, **Catrin Strobel**, Mirja Fassbender, Bettina Willie, Gerhard Schmidmaier

Injury, Int. J. Care Injured: 42 (2011) 746–752

Impact Factor: 2,269

ABSTRACT

Delayed healing is still a severe complication in the clinic. The aim of the present study was to investigate the effect of locally delivered BMP-2 incorporated in a poly(D,L-lactide) (PDLLA) implant coating in a rat model with delayed tibial healing. The healing delay in this model is not caused by mechanical instability or additional tissue manipulation and presents therefore a common and challenging clinical situation of impaired healing. Radiological, histological and biomechanical evaluations were performed at days 5, 10, 28, 42, and 84 after tibial osteotomy. The control group showed a delayed healing without complete bridging and without reaching the biomechanical stability of the contralateral tibiae after 84 days. The mechanical stability of the BMP-treated tibiae showed a significant increase at days 28 and 42 compared to the control group and exceeded the stability of the intact contralateral tibiae. Less cartilage was detected at day 28 and the mineralization was significantly enhanced at day 42 due to the local BMP application. Looking at the early healing phase (day 10) a reduced vascularization was seen in the BMP group. This reflects the situation seen during normal healing, whereas the delayed healing in the present model had an increased vascularization. The present study clearly demonstrates that local BMP-2 application can stimulate delayed healing in a clinically relevant animal model.

LINK: <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2010.11.012>

PUBLIKATION 2

Local Inhibition of Angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model

Mirja Fassbender, **Catrin Strobel**, Juliane S. Rauhe, Camilla Bergmann, Gerhard Schmidmaier und Britt Wildemann

European Cells and Materials: Vol. 22 2011: 1-11

Impact Factor: 9,650

ABSTRACT

Long bone and in particular tibia fractures frequently fail to heal. A disturbed revascularization is supposed to be a major cause for impaired bone healing or the development of non-unions. We aim to establish an animal model, which reliably mimics the clinical situation. Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and primary human osteoblast like cells (POBs) were cultured with different angiogenesis-inhibitors (Fumagillin, SU5416, Artesunate and 3,5,4'-Trimethoxystilbene) released out of poly(D,L-Lactide) (PDLLA) coated k-wires and cell activity was determined. Discs containing PDLLA or PDLLA + Fumagillin/Artesunate were placed at the chorionallantoic membrane of hen eggs and the effect on vessel formation and egg vitality was observed. Tibia osteotomy was performed in rats and stabilized with K-wires coated with PDLLA + Fumagillin or with PDLLA only (control group). The healing was compared at different time points to the PDLLA control. Fumagillin and Artesunate inhibited the activity of HMEC-1 with minor effect on POBs. Artesunate caused embryonic death, whereas Fumagillin had no effects on egg vitality, but reduced the blood vessels. In the animal study all rats showed an impaired healing with reduced biomechanical stability. The Fumagillin treated tibiae had a significantly decreased callus size at day 42 and 84, less blood vessels in the early callus, a reduced histological callus size at day 10, 28 and 84, as well as an altered callus composition. This study presents a less vascularized, atrophic, tibia non-union and can be used in further investigations to analyze the pathology of atrophic non-union and to test new interventions.

LINK: <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol022/vol022a01.php>

PUBLIKATION 3

Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer

Catrin Strobel, Gerhard Schmidmaier, Britt Wildemann

International Journal of Artificial Organs: 2011; 34 (3): 304-316

Impact Factor: 1,503

ABSTRACT

Creating orthopedic implants that locally deliver drugs is an appealing approach to induce bone regeneration and prevent or treat infections. In this study, titanium K-wires were coated with poly(D,L-lactide) (PDLLA) solutions with different polymer/solvent/drug ratios to modify the release kinetics of the antibiotic gentamicin. The concentrations of PDLLA ranged from one-fold (100 mg/1.5 mL solvent, 1X) to four-fold (400 mg/1.5 mL solvent, 4X), where the higher concentrations led to the thickening of the drug-loaded coatings and an increase of total coating mass. Coated wires were incubated in PBS buffer at 37°C for up to 32 weeks, and the elution kinetics were analyzed at several time points. Different release profiles were observed: I) a burst release within the first hours for the coatings made out of lower concentrations of PDLLA with higher amounts of gentamicin and II) a sustained release of up to 14 weeks for the different coatings with higher polymer amounts with lower concentrations of gentamicin. Moreover, the amounts of remaining gentamicin on the wires after elution were dependent on the coating composition. Nearly complete gentamicin was released from the 1X PDLLA coatings and approximately one-third with respect to initial gentamicin remained in the 4X coatings. Based on these results, we garnered a better understanding of the parameters that influenced release kinetics in this simple system and described how to realize different release patterns by using only one polymer. Using this knowledge, tailored coated implants that can improve infection prophylaxis or stimulate bone healing may be designed.

LINK: <http://dx.doi.org/10.5301/IJAO.2011.6470>

PUBLIKATION 4

Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants

Catrin Strobel, Nicole Bormann, Anke Kadow-Romacker, Gerhard Schmidmaier und Britt Wildemann

Journal of Controlled Release: 156 (2011) 37-45

Impact Factor: 7,164

ABSTRACT

The local application of antibiotics in combination with timely controlled growth factor delivery might be beneficial for the prevention of infections and to stimulate bone healing. Therefore, in this study a variable sequential drug delivery system with three distinctly different releases profiles was developed: i) a burst release of gentamicin, ii) a burst release of IGF-I followed by a sustained release, and iii) a slow sustained release of BMP-2 out of an implant coating. Only one polymer [poly(D,L-lactide)], incorporating gentamicin, IGF-I or BMP-2, was used for two- or three-layer coatings of K-wires. To control the release kinetics, the polymer concentrations in the solvent were varied. The activity of early released gentamicin from a two-layer coating was confirmed microbiologically and BMP-2 stimulated the metabolic activity and alkaline phosphatase activity of C2C12 cells after two weeks. From the three-layer coated wires, IGF-I continuously stimulated the cell proliferation, whereas BMP-2 enhanced ALP between one to three weeks. The sequential release of growth factors revealed an additive effect on the metabolic activity and ALP of primary osteoblast-like cells compared to the single coated controls. The controlled delivery of different factors from one implant might prevent infections and subsequently stimulate the different phases of bone healing.

LINK: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.006>

PUBLIKATION 5

Evaluation of process parameter of an automated dip-coating

Catrin Strobel*, Anke Kadow-Romacker*, Tom Witascheck, Gerhard Schmidmaier, Britt Wildemann

*contributed equally to the present study

Materials Letters: 65 (2011) 3621-3624

Impact Factor: 2,117

ABSTRACT

Dip coating is a common technique for the optimization of metallic implants, whereas several steps during the procedure influence the coating. This study aims in the development of a coating apparatus and the evaluation of critical steps, such as mixing, immersion, retention and withdrawal velocity during the procedure. In addition the influence of the polymer solution viscosity, poly(D,L-lactide) dissolved in ethyl acetate, was analyzed. As a therapeutic drug, gentamicin was incorporated and the amount in the different coatings quantified. With increased withdrawal velocity and viscosity the thickness of the coating layer increased. This was accompanied by an increase in incorporated drug. The mixing, immersion and retention time had almost no effect. The viscosity of the polymer solution and the withdrawal velocity can therefore be used to modify bioactive coatings for optimized local drug loading.

LINK: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2011.07.102>

Mein Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

1. *Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix*
A. Bader, G. Steinhoff, **C. Strobel**, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching, D. Tsikas, J. Froelich, A. Haverich
Transplantation; 2000 Jul 15;70(1):7-14
2. *Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies: effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions*
K. Zeilinger, I.M. Sauer, G. Pless, **C. Strobel**, J. Rudzitis, A. Wang, A.K. Nüssler, A. Grebe, L. Mao, S.H. Auth, J. Unger, P. Neuhaus, J.C. Gerlach
Alternatives to Laboratory Animals; 2002 Sep-Oct;30(5):525-38
3. *Automatisierte Bestimmung von Zellzahlen und Vitalitäten*
C. Strobel
Bioforum Zellbiologie; April 2004
4. *Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase*
M. Buggisch, B. Ateghang, C. Ruhe, **C. Strobel**, M. Wartenberg, H. Sauer
Journal of Cell Science; 2007 Mar 1;120(Pt 5):885-94
5. *Carrier systems and applications of growth factors in orthopaedics*
G. Schmidmaier, P. Schwabe, **C. Strobel**, B. Wildemann
Injury; 2008 Sep;39 Suppl 2:S37-43. Review
6. *Feasibility of using sodium chloride as a tracer for the characterization of the distribution of matter in complex multi-compartment 3D bioreactors for stem cell cultures*
J.C. Gerlach, T. Witascheck, **C. Strobel**, C.A. Brayfield, R. Bornemann, G. Catapano, K. Zeilinger
International Journal of Artificial Organs; 2010 Jun;33(6):399-404
7. *Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff*
S. Pauly, F. Klatte, **C. Strobel**, G. Schmidmaier, S. Greiner, M. Scheibel, B. Wildemann
European Cells and Materials; 2010 Jul 26;20:84-97
8. *Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model*
B. Wildemann, K. Lange, **C. Strobel**, M. Fassbender, B. Willie, G. Schmidmaier
Injury; 2011 Aug;42(8): 746-52. (Epub 2010 Dec 4)
9. *BMP-2 and BMP-7 affect human rotator cuff tendon cells in vitro*
S. Pauly, F. Klatte, **C. Strobel**, G. Schmidmaier, S. Greiner, M. Scheibel, B. Wildemann
Journal of Shoulder and Elbow Surgery; 2011 Mar 29 [Epub ahead of print]

10. *Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer*
C. Strobel, G. Schmidmaier, B. Wildemann
International Journal of artificial organs; 2011 Mar;34(3):304-16

11. *Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model*
M. Fassbender, **C. Strobel**, J.S. Rauhe, C. Bergmann, G. Schmidmaier, B. Wildemann
European Cells and Materials Journal, 2011 Jul 6:22 1-11

12. *Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants*
C. Strobel, N. Bormann, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, B. Wildemann
Journal of Controlled Release; Nov 156 (2011) 37-45

13. *Evaluation of process parameter of an automated dip-coating*
C. Strobel, A. Kadow-Romacker, T. Witascheck, G. Schmidmaier, B. Wildemann
Materials Letters; 65 (2011) 3621-3624

1. **BONE TEC**

Hannover, November 2008

Vortrag: „Characterization of primary human tenocytes“

C. Strobel, S. Pauly, F. Klatte, G. Schulze-Tanzil, G. Schmidmaier, B. Wildemann

2. **16. JAHRESKONGRESS DER DVSE, DEUTSCHEN VEREINIGUNG FÜR SCHULTER- UND ELLENBOGENCHIRURGIE E.V.**

Hamburg, April 2009

Vortrag: „Untersuchung und Charakterisierung von primären humanen Tenozyten der Rotatorenmanschette“

S. Pauly, F. Klatte, **C. Strobel**, B. Wildemann, M. Scheibel

3. **DKOU, DEUTSCHER KONGRESS FÜR ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE**

Berlin, Oktober 2009

Poster und Kurzvortrag: „Einfluss von Wachstumsfaktoren auf primäre humane Tenozyten“

F. Klatte, **C. Strobel**, S. Pauly, M. Scheibel, B. Wildemann, G. Schmidmaier

4. **2ND CHINA-EUROPE SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS IN REGENERATIVE MEDICINE**

Barcelona, Spanien, November 2009

Vortrag: “Modifying the Coating of Titanium Nails to Realize Sequential Drug Release”

C. Strobel, G. Schmidmaier, B. Wildemann

5. **ORS, ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY ANNUAL MEETING**

New Orleans, USA, März 2010

Poster und Kurzvortrag: “Sequential drug release of antibiotic and growth factor from titanium nails”

C. Strobel, N. Bormann, G. Schmidmaier, B. Wildemann

6. **OSTEOLOGIE**

Berlin, März 2010

Vortrag: „Einfluss von Angiogenese-Inhibitoren auf die Knochenheilung“

M. Fassbender, **C. Strobel**, J.S. Rauhe, G. Schmidmaier, B. Wildemann

Vortrag: „Stimulation der verzögerten Osteotomieheilung durch lokale BMP-2 Applikation“

B. Wildemann, K. Lange, **C. Strobel**, M. Fassbender, G. Schmidmaier

7. **DKOU, DEUTSCHER KONGRESS FÜR ORTHOPÄDIE UND UNFALLCHIRURGIE**

Berlin, Oktober 2010

Vortrag: „Sequentielle Freisetzung von Gentamicin und BMP-2 aus einer Implantatbeschichtung“

C. Strobel, N. Bormann, G. Schmidmaier, B. Wildemann

8. **ORS**, ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY ANNUAL MEETING
Long Beach, USA, Januar 2011

Poster: "Three Substances in one Polymer Coating Sequentially Released from titanium wire"

C. Strobel, A. Kadow-Romacker, N. Bormann, G. Schmidmaier, B. Wildemann

Poster: „BMP-2, IGF-I and TGF- β 1 reveal different effects on the co-culture of osteoblast- and osteoclast-like cells“

B. Wildemann, N. Bormann, **C. Strobel**, G. Schmidmaier

Poster: „Influence of Growth Factors (BMP-2, BMP-7) on Human Rotator Cuff Tendon Cells“

S. Pauly, F. Klatte, **C. Strobel**, G. Schmidmaier, S. Greiner, M. Scheibel, B. Wildemann

9. **ECM XII**, EUROPEAN CELLS & MATERIALS, IMPLANT INFECTION
Davos, Schweiz, Juni 2011

Poster: „Infection prophylaxis and healing stimulation in one step“

C. Strobel, N. Bormann, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, **B. Wildemann**

Vortrag: „Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants“

B. Wildemann, **C. Strobel**, N. Bormann, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier

1. APOA (ASIA PACIFIC ORTHOPAEDIC ASSOCIATION) PFIZER BEST SCIENTIFIC PAPER AWARD FOR ORTHOPAEDIC INFECTION

eCM XII: Implant Infection, Davos, Schweiz, Juni 2011

C. Strobel, N. Bormann, A. Kadow-Romacker, G. Schmidmaier, B. Wildemann

„Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants“

Journal of Controlled Release; Nov 156 (2011) 37-45

2. Der OSKAR UND HELENE-MEDIZINPREIS 2011 (Orthopädie und Unfallchirurgie) wurde an PROF. BRITT WILDEMANN UND PROF. GERHARD SCHMIDMAIER verliehen.

Grundlage für diesen Preis waren die fünf wichtigsten Arbeiten aus den letzten drei Jahren zum Thema „Stimulation der Knochenheilung bei Frakturen und/oder der Osteointegration von Endoprothesen“.

Zwei der fünf bewerteten Arbeiten waren:

C. Strobel, G. Schmidmaier, B. Wildemann

„Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer“

International Journal of artificial organs; 2011 Mar;34(3):304-16

B. Wildemann, K. Lange, **C. Strobel**, M. Fassbender, B. Willie, G. Schmidmaier

“Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model“

Injury; 2011 Aug;42(8):746-52. (Epub 2010 Dec 4)

„Ich, Catrin Strobel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Sequentielle Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer Implantatbeschichtung zur
Behandlung von Knochendefekten“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 31.05.2012

Catrin Strobel

DANKSAGUNG

Dies ist die Stelle an der es gilt, die Zeit als Doktorandin zu resümieren und auf die vermutlich üblichen Hochs und Tiefs zurück zu blicken.

Denke ich an den steinigen Beginn zurück, gilt mein tiefer Dank meiner Doktormutter und Betreuerin BRITT WILDEMANN, die mir von Anfang an vollstes Vertrauen entgegenbrachte und mir über die gesamte Zeit zur Seite stand. Unsere konstruktiven Diskussionen waren ein fester und wertvoller Wegbegleiter dieser Arbeit. Ich danke auch meinem klinischem Betreuer GERHARD SCHMIDMAIER, der trotz stressigem Klinikalltag (fast) immer ansprechbar war und ist.

Ein dickes Dankeschön geht natürlich an ANKE KADOW-ROMACKER und NICOLE BORMANN, die für mich da waren und mich in der zweiten Hälfte der Arbeit tatkräftig unterstützten. Ein besonderer Dank geht an Anke, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich falls nötig mit ihrem frischen und optimistischen Wesen wieder aufbaute und motivierte.

Ich bin dankbar all die Menschen im Julius Wolff Institut und BCRT kennengelernt zu haben, die mich kurz- oder langfristig auf diesem intensiven Weg begleiteten und aus der so manch eine Freundschaft entstand.

MEINEN ELTERN danke ich für ihre familiäre Unterstützung in allen Lebenslagen. Ein verwunderter und bewundernder Dank geht an meinen BRUDER PETER und meine LIEBLINGSSCHWÄGERIN SABINE, die irgendwie schon immer an mich und meinen beruflichen Werdegang geglaubt haben und die letztendlich dadurch meinen Ehrgeiz weckten und mich motivierten ☺.

Zu guter Letzt danke ich aus tiefstem Herzen meinem besten Freund und Ehemann DIRK REHAHN für die wunderbare Zeit die ich mit ihm erleben darf, seine Geduld, seinen Optimismus, sein offenes Ohr, seine Fürsorge und vieles, vieles mehr...