

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

Dissertation

**Untersuchung des Einflusses eines  
nicht-viralen BMP-2-Gentransfers auf  
die Implantateinheilung  
am Kaninchenmodell**

**Biomechanische Untersuchung**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Julius Sebastian Höhne  
aus Berlin

....

Gutachter/in:      1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Wildemann  
                         2. Prof. Dr. A. Stemberger  
                         3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Heise

Datum der Promotion: 18.09.2009

*„Wer ein WARUM zum Leben hat, erträgt fast jedes WIE“*

*Friedrich Nietzsche*

*“In God we trust, all others must bring data.”*

*William Edwards Deming*

**DankAnLiebeElternBruderSchwesterFreundin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Klinische Problematik .....	2
1.2 Implantologie und Osteointegration .....	4
1.3 Der Stand der Forschung .....	5
1.3.1 Knochen .....	5
1.3.2 Knochenheilung .....	5
1.3.3 Wachstumsfaktoren .....	7
1.3.4 BMP .....	8
1.3.5 Gentherapie in der Knochenheilung .....	10
1.3.6 Plasmide und Genvektoren .....	12
1.3.7 Physiologische Barrieren der Gentherapie .....	15
1.3.8 Copolymer Protected Gene Vectors - COPROGs .....	16
1.3.9 Trägermaterial Fibrin .....	19
1.4 Ziel und Hypothesen .....	22
1.4.1 Ziel des Versuchsvorhabens .....	22
1.4.2 Hypothese des Versuchsvorhabens .....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Studiendesign .....	23
2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsplanung .....	24
2.3 Implantat .....	26
2.4 Fibrinkleber .....	26
2.5 Plasmid .....	26
2.6 Operatives Vorgehen .....	27
2.7 Radiologische Untersuchung .....	31
2.8 Biomechanische Untersuchung .....	32
2.8.1 Knochenentnahme .....	32
2.8.2 Knochenvorbereitung .....	32
2.8.3 Knocheneinbettung .....	33
2.8.4 Der „Push-out“ Test .....	34
2.8.5 Auswertung .....	36
2.9 Histologische Untersuchung* .....	37
2.10 Untersuchung der systemischen Transfektion** .....	38
2.11 Statistik .....	39

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	Operation und makroskopische Befunde.....	40
3.2	Blutbild und -serum Untersuchungen.....	40
3.3	Körpergewicht und Körpertemperatur .....	42
3.4	Radiologische Untersuchung.....	43
3.5	Biomechanische Testung.....	45
3.6	Histologische Untersuchung* .....	52
3.7	Untersuchung der systemischen Transfektion* .....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	53
4.1.1	BMP-2 Gruppe.....	54
4.1.2	Fibrin- und Kontrollgruppe.....	57
4.1.3	Sicherheitsuntersuchung, Blutwerte und Gewicht.....	59
4.1.4	COPROG, Transfektion und Expression.....	59
4.1.5	Dosis- und Applikationsart .....	61
4.2	Diskussion der Methoden .....	63
4.2.1	Tiermodell.....	63
4.2.2	Biomechanik und Belastungsbedingung.....	65
4.2.3	Radiologische Untersuchung .....	68
4.3	Klinische Relevanz und Ausblick .....	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>99</b>
11.1	Erklärung an Eides Statt .....	99
11.2	Curriculum vitae.....	100
11.3	Publikationsverzeichnis .....	101

# 1 Einleitung

Als Julius Wolff 1892 das „Gesetz der Transformation der Knochen“<sup>1</sup> als Direktor der ersten noch privat finanzierten „Poliklinik für orthopädische Chirurgie“ an der Charité formulierte, dauerte es zwei weitere Jahre bis zur vollständigen Einbindung des Instituts in die Universität. Es bedurfte der Unterstützung des Dekans Langenbeck, des Physiologen Du Bois und des Chirurgen Roux und gilt als Geburtsstunde der Orthopädie als eigenständige Fachrichtung. Als Weiterentwicklung der Darwinschen Erkenntnis, dass ohne Reiz weder organische Arbeit noch Entwicklung passiert, besagt das Wolff'sche Gesetz im Kern, dass die Natur unter normalen Bedingungen bestrebt ist, die Knochenfunktion zu erhalten, unter pathologischen Bedingungen aber, sie wieder herzustellen. Es gilt bis heute als das Standardwerk der Orthopädie. Parallel dazu entdeckte Senn 1889, dass dekalzifizierter Knochen defekten Knochen heilen kann. Levander zeigte 1930 als erster, dass die Injektion von zellfreiem Knochenextrakt in die Muskulatur von Kaninchen Knorpel und Knochenformation zur Folge hatte<sup>2</sup>. Diese erste Forschung über knocheninduktive Substanzen gipfelte 1965 in Marshall Urist's Entdeckung, dass eine Substanz in der Knochenmatrix osteoinduktive Eigenschaften hat<sup>3</sup>. Er nannte diese kurze Zeit später BMPs (Bone Morphogenetic Protein)<sup>4, 5</sup>. Seit der Entdeckung dieser Substanz durch Urist sind mittlerweile über 20 individuelle BMP's mit unterschiedlichen Eigenschaften charakterisiert worden<sup>6, 7</sup>. Seit 2001 ist der Wachstumsfaktor BMP-7 (Osigraft<sup>®</sup>, OP-1 Implant<sup>®</sup>) und seit 2002 auch BMP-2 (INFUSE<sup>®</sup>, InductOs<sup>®</sup>) in rekombinanter Form zur klinischen Anwendung im Bereich der Unfallchirurgie und Orthopädie von der amerikanischen Behörde für Arzneimittelsicherheit (FDA) zugelassen. In der vorliegenden Arbeit wird in einer tierexperimentellen Studie ein neuer gentherapeutischer Ansatz zur Beeinflussung der Implantateinheilung mittels BMP-2 Plasmiden untersucht. Das Ziel soll sein einen Beitrag zu leisten für die Grundlagenentwicklung neuer Gentransfertechnologien, die in den kommenden Jahren zur schnelleren Osteointegration und damit zur verbesserten Implantateinheilung verwendet werden können. Nach einleitenden Hinweisen auf die klinische Problematik, die Implantologie und den Stand der Forschung, wird näher auf die Hypothese und die Zielstellung des Forschungsvorhabens eingegangen.

## 1.1 Klinische Problematik

Die Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung (BQS) zeigt in ihren aktuellen Daten, dass mehr als die Hälfte der chronischen Erkrankungen bei Menschen über 60 Jahre die Gelenke betreffen. 2005 sind in Deutschland arthrosebedingt 368 Tsd. Patienten behandelt worden. 2007 sind deutschlandweit 355 Tsd. künstliche Knie- und Hüftgelenke eingesetzt worden - gegenüber 220 Tsd. im Jahr 1996. Die Schätzung der Inzidenz liegt momentan bei 110-114 Fällen/100 Tsd. Einwohner im Jahr, wird aber aufgrund der demographischen Entwicklung jährlich um 3-5% steigen, wie das BQS voraussagt<sup>8</sup>. Laut statistischem Bundesamt verursachten Verletzungen und Erkrankungen der Knochen und Gelenke im Jahre 2004 16% der direkten Krankheitskosten in Höhe von 35,5 Mrd. Euro<sup>9</sup>. Diese Krankheiten sind auch Ursache für 40% aller Arbeitsunfähigkeitstage und für 25% der vorzeitigen Berentungen. Weiterhin stellt das statistische Bundesamt einen Anstieg der Behandlung dieser Erkrankung zwischen 1994 und 2005 um 37,1% fest. Weltweit werden jedes Jahr über 2 Mio. Gelenke durch eine Total- oder Hemiendoprothese ersetzt. Indikationen für den Gelenkersatz sind Arthrose, Trauma, Fehlbildungen oder andere idiopathische, toxische oder rheumatogene Gelenksdestruktionen. Die demographischen Daten sprechen auch weltweit für eine Zunahme der Indikationen für Gelenkersatz.

Ein Problem stellt die oft nicht zufriedenstellende Haltbarkeit der Prothesen dar. Die meisten Bestrebungen, die derzeit auf diesem Gebiet unternommen werden, dienen dazu, diese zu steigern und so die Zahl der Revisionen zu senken. In den ersten drei Monaten nach Implantation einer Hüftendoprothese kommt es zum Knochenverlust von bis zu 14%<sup>10</sup>. Trotz aller Fortschritte tritt bei vielen Patienten eine Lockerung auf, die einen erneuten Eingriff unabwendbar macht<sup>11</sup>. Im direkten Vergleich mit dem ersten Eingriff sind diese Wechseloperationen mit einem größeren operativen Blutverlust, einer längeren Eingriffsdauer und einer Zunahme von Komplikationen verbunden, die in der Folge zu einer höheren Infektions- und Dislokationsrate führen, die Liegedauer im Krankenhaus verlängern und die Mortalität erhöhen<sup>12</sup>. Zudem werden Beinvenenthrombosen bei länger andauernder Immobilisation wahrscheinlicher, bis zu 5% der davon betroffenen Patienten versterben an einer Lungenembolie<sup>13</sup>. Die psychische<sup>14</sup> und sozioökonomische Belastung der Patienten (Belastung der Familie, Arbeitsunfähigkeit, etc.) steigt. Die Kosten für die primäre Operation und die nachfolgende Behandlung der Komplikationen haben ansteigende

volkswirtschaftliche Konsequenzen. Die WHO hat die erste Dekade des neuen Jahrtausends zur „Bone and Joint Decade<sup>15</sup>“ ernannt und sich zum Ziel gesetzt, die öffentliche Aufmerksamkeit auf diese Probleme zu lenken um durch weltweite Maßnahmen die Prävention zu stärken und die wissenschaftlichen Forschung voranzutreiben.

- Laut WHO bedingen Gelenkerkrankungen weltweit bei Menschen über 65 die Hälfte aller chronischen Erkrankungen.
- Es wird geschätzt, dass Polytraumen, verursacht durch Verkehrsunfälle und Kriegsfolgen, einer enormen Anstrengung im Bereich der Prävention und der Behandlung bedürfen.
- Weitere Schätzungen besagen, dass 25% der Ausgaben entwickelter Länder im Gesundheitsbereich im Jahre 2010 für die Versorgung von Unfällen und ihrer Folgen aufgewendet werden.
- Trotz großer Fortschritte in der Vergangenheit verhindern weiterhin viele verunstaltende Knochenkrankheiten besonders bei Kindern eine normale Entwicklung.

Bei weiteren aus den U.S.A. vorliegenden Daten (Musculoskeletal Injuries Report 2000, AAOS) zeigt sich folgendes Ausmaß:

- 7,9 Mio. Frakturen jedes Jahr in den U.S.A.
- 5-10% davon mit verspäteter oder unzureichender Knochenheilung
- Die damit verbundenen Kosten von 56 Mrd. \$ werden nur von Herz-Kreislauf Krankheiten übertroffen.
- 28 Mrd. \$ werden alleine für die Behandlung der Frakturen verwendet (National Trauma Data Bank Report 2002, The American College of Surgeons)



## 1.2 Implantologie und Osteointegration

1890 begann mit der ersten von Themistocles Gluck in Berlin implantierten Kniegelenksendoprothese eine Erfolgsgeschichte. Seine Idee war eine mit Kolophonium und Gips fixierte Endoprothese aus Elfenbein. Das Konzept der Zementfixation setzte sich allerdings erst über ein halbes Jahrhundert später durch. Im heutigen klinischen Gebrauch stehen sich die zementfreie sowie die zementierte Implantatverankerung gegenüber. Auch in absehbarer Zukunft wird man ohne die mittlerweile mehrfach technologisch verbesserte Zementverankerung nicht auskommen können. Dessen ungeachtet bedient sich die orthopädische Chirurgie gegenwärtig in der Hälfte aller Hüftgelenksendoprothesen der zementfrei implantierten Form. Diese Zunahme betrifft meist das jüngere Patientenkollektiv.

Jährlich wird in Deutschland eine Vielzahl von Patienten operativ mit Dauerimplantaten des knöchernen Skeletts behandelt. Beispiele sind Hüft-, Knie- und Zahnimplantate. Die genaue Indikationsstellung, der Allgemeinzustand des Patienten, Operationstechnik und nicht zuletzt die Charakteristika des Implantats bestimmen den erfolgreichen Behandlungsablauf. Die Anforderungen an ein Implantat sind frühes und grenzsichtarmes Einheilen mit dem Ziel der biologischen und dauerstabilen Verankerung, um schmerzfreie Belastbarkeit und Beweglichkeit zu gewährleisten. Die Implantatoberfläche wird bestimmt durch den Werkstoff und seine Formgebung. Die Biokompatibilität wird maßgeblich beeinflusst durch die Art der chemischen Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Materials. Optimalerweise harmonisieren beim Gelenkersatz das biologische System Mensch und das technische System Implantat. Dauerhafte Sekundärstabilität der Endoprothese mit direktem Knochen-Implantat-Verbund ist das Ziel. Dieses Prinzip wird Osteointegration genannt<sup>16</sup>. Erreicht wird dies durch das Einwachsen von Knochen an die geeignete Oberfläche ohne eine größere bindegewebige Zwischenschicht. Radiologisch ist hierbei keine Trennschicht zwischen dem Implantat und dem Knochen erkennbar, da es sich um eine sehr schmale, weichgewebige Schicht handelt. Um eine maximale anfängliche Stabilität ohne Relativbewegungen zu erreichen, wird versucht eine möglichst genaue Passform zwischen Implantat und Implantatlager zu erreichen. Durch das passgenaue Prinzip des „press-fit“ Formschlusses kann dies mit Einpassen des Implantats mit einer Druckvorspannung erreicht werden. Das Implantat wird in das Knochenbett eingeschlagen und es kommt im günstigsten Fall zur Verklebung der Grenzflächen. Die weiteren Anpassungsprozesse der

Knochenheilung bewirken einen Abbau der Vorspannung. Dauerhaft stabil sitzt die Prothese durch Knochenwachstum am Prothesenkörper.

## **1.3 Der Stand der Forschung**

### **1.3.1 Knochen**

Knochen ist das ultimative Biomaterial. Er erreicht eine Festigkeit von gegossenem Stahl und ist dabei nicht schwerer als Holz<sup>17</sup>. Der Knochen kann sich den funktionellen Anforderungen ständig neu anpassen und sich selbst reparieren. Neben der Bewegungsmöglichkeit gewährleistet Knochen eine Schutzfunktion der inneren Organe und des Knochenmarks. Nicht zuletzt ist Knochen das größte Reservoir des Körpers an Calcium (99%) und Phosphat. Die zeitlebens stattfindenden Umbauprozesse des Knochens sorgen für eine Anpassung der Gewebekomposition und -struktur an jeweils aktuelle Belastungen<sup>18</sup>.

Ausgereifter Knochen besteht aus Proteinen und Mineralien<sup>19</sup>. Auf das Trockengewicht bezogen sind etwa 65% anorganisch mit dem Hauptbestandteil Hydroxylapatit, bestehend aus Kalzium und Phosphat. 35% sind organische Matrix. Sie wird vor der Mineralisierung gebildet und bildet das Gerüst des Knochens. Die Matrix setzt sich wiederum zu 90% aus Kollagen I, dem häufigsten Körperprotein zusammen. Weiterhin besteht die Matrix aus 2,5% Osteonektin, 1,5% Osteokalzin, 1,5% Phosphoproteinen, Thrombospondin, Proteoglykanen, Knochensialoprotein und zu weniger als 0,1% aus Wachstumsfaktoren<sup>20</sup>.

### **1.3.2 Knochenheilung**

Durch An- und Abbau der Knochenstruktur unterliegt der Knochen einer ständigen Anpassung an die mechanische Belastung und weist somit eine starke Plastizität auf, welche auch bei der Heilung deutlich wird. Anders als bei vielen anderen Reparaturprozessen der körperlichen Heilung wird hier kein Ersatzgewebe gebildet sondern in einer Art Wiederholung des embryonalen Wachstums neuer Knochen gebildet. Knochenheilung setzt die Proliferation und

Differenzierung verschiedener Gewebe in sequenzieller Abfolge voraus, gefolgt von abschließendem Umbau.

Wird die mechanische Belastbarkeit des Knochens überschritten, was durch Über- und Fehlbelastung oder Traumata geschehen kann -, kommt es zum Bruch der Knochenstruktur, die durch eine große Anzahl von Frakturtypen gekennzeichnet ist. Zur klinischen Versorgung von Knochenbrüchen und -defekten steht eine stetig wachsende Zahl von Osteosynthesematerialien zur Verfügung. Die bereits erwähnten klinischen Probleme erfordern technische Verbesserungen und Neuentwicklungen, um eine optimale Knochenheilung zu gewährleisten. Die Optimierung der biomechanischen Eigenschaften der Implantate scheint mit der Einführung winkelstabiler Systeme weitgehend ausgeschöpft zu sein, während die Biologisierung von Implantaten oder das Einbringen von bioaktiven Substanzen hingegen eine Vielzahl von Optionen zur Verbesserung der Einheilung beinhalten dürfte. Bei der (1) *Osteokonduktion* wird eine passive Leitstruktur zur Förderung des Ein- und Auswachsens von Knochen unter Einsatz von Füllmaterialien<sup>21</sup> wie Autografts (die Eigenknochenspende), Allografts (die Fremdknochenspende), sowie demineralisierte Knochenmatrix, und DBM<sup>22</sup>, das eine Aufbereitung aus demineralisierter Knochenmatrix und auch künstliche Materialien wie Keramiken, Polymeren, Kompositen oder Membranen<sup>23</sup> darstellt, geschaffen<sup>24-26</sup>. Wichtige Eigenschaften sind (2) *Biokompatibilität* - das Ausbleiben einer Immunreaktion-, Resorbierbarkeit und Materialbeschaffenheit mit geeigneter Oberfläche und adäquater Porengröße, die das Einwachsen von Zellen und Gefäßen ermöglichen<sup>27</sup>. (3) *Osteoinduktion* löst aktiv die Stimulation der Knochenheilung durch das Anlocken von Zellen in das regenerierende Gewebe aus, deren Differenzierung dort gezielt gefördert wird<sup>28, 29</sup>. Osteoinduktive Stimulanzen sind Hormone und Wachstumsfaktoren welche die Rekrutierung und Differenzierung von Zellen bewirken. Schließlich besitzt osteogenes Material Zellen, die sich aktiv differenzieren und zum Knochenaufbau fähig sind. (4) *Osteogene* Eigenschaften, d.h. die Fähigkeit von differenzierte Knochenzellen oder induzierten Stammzellen Knochengewebe zu bilden, haben z.B. Autografts oder Stammzellen<sup>30</sup>. (5) *Osteointegration* ist für die Haltbarkeit in der Implantologie unabdingbar und bedeutet die Fähigkeit des neugebildeten Knochens einen festen Verbund mit dem Implantat zu bilden.

Die Idee Knochenheilung zu beeinflussen<sup>31</sup> geht viele Jahre zurück auf die ersten orthopädischen Forscher wie Job von Meekeren und John Hunter<sup>32</sup>. Der Arzt und Chirurg

Meekeren soll 1668 den Schädeldeckendefekt eines Soldaten mit einem Knochenstück aus einem Hundeschädel gedeckt haben. Der anekdotische Bericht besagt weiterhin, dass der Patient nach der Genesung aufgrund der Xenogenität des Knochematerials exkommuniziert und die Entfernung des Knochens verlangt wurde, was aufgrund der zwischenzeitlich stattgefundenen Einheilung nicht mehr durchgeführt werden konnte. Der Anatom und Chirurg Hunter machte bereits 1771 Versuche zu Knochenheilung und Zahnaufbau. Connolly et al. berichteten 1986 von der erfolgreichen perkutanen Knochenmarkinjektion bei der Behandlung von Pseudarthrosen<sup>33</sup>. Seit Urist<sup>3</sup> Entdeckung von BMPs sind osteoinduktive Zytokine umfangreicher Gegenstand der Forschung geworden.

### 1.3.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die als Zytokine den interzellulären Informationsaustausch gewährleisten. Sie stellen quantitativ weniger als 0,1% des Trockengewichts von Knochen<sup>19</sup>, sind aber unentbehrliche Steuerelemente beim Knochenstoffwechsel. Sie beeinflussen die Zellteilung, Matrixsynthese und Gewebedifferenzierung in nahezu allen Organsystemen. Physiologisch ist die Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren in der Regel sehr kurz<sup>34</sup>. Ausgeschüttete Wachstumsfaktoren haben systemische oder lokale Effekte, die über endokrine, parakrine oder autokrine Signalwege wirksam werden<sup>35-38</sup>. Historisch lehnt sich die Nomenklatur von Wachstumsfaktoren an den Ort der Entdeckung oder die zugesprochene Funktion an. Dadurch entziehen sie sich einer umfassenden Taxonomie, und ihre Namen werden aus der Tradition heraus beibehalten<sup>29</sup>. Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiven Eigenschaften konnten in vielen Arbeiten nachgewiesen werden<sup>28, 37, 39-47</sup>. Einige davon wirken auf chondro- oder osteogene Zellen<sup>48-52</sup> und aktivieren somit den synchron ablaufenden anabolen und katabolen Knochenstoffwechsel<sup>53-55</sup>.

### 1.3.4 BMP

Der Name Bone Morphogenetic Protein (BMP) beschreibt nur eine bestimmte Funktion dieser Proteine, aber sie spielen in unzähligen biologischen Prozessen eine Rolle<sup>56</sup>. Namensgebend für diese Proteinfamilie war die ursprüngliche Entdeckung, dass demineralisierter Knochenextrakt ektope Knochenbildung induziert<sup>3</sup>. In einem Kilogramm Knochen (Trockengewicht) befindet sich etwa ein Mikrogramm BMP. Dieses Protein gehört aufgrund der Strukturhomologie zur Zytokingruppe der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie<sup>57</sup>, und bewirkt ektope Knochenbildung<sup>3, 58-60</sup>. Auch Speziesübergreifend zeigen sich Homologien, so beispielsweise mit dem *Drosophila Decapentaplegic* (dpp) Gen<sup>61</sup>. Die BMP-Proteinfamilie wird ausgiebig erforscht und umfasst aktuell 20 Mitglieder<sup>6, 7</sup>. Durch Chemotaxis locken sie mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum an Bruchstellen aber auch an ektope Orte<sup>62</sup> und induzieren die Differenzierung zu Chondrozyten oder Osteoblasten<sup>63</sup>, die bei der enchondralen Osteogenese eine zentrale Stellung einnehmen (siehe Abb. 1). Die BMP sind sowohl in heterodimerer als auch in homodimerer Konformation biologisch aktiv, zeigen jedoch in heterodimerer Konformation mehr Aktivität<sup>64</sup>. Als die effektivsten Wachstumsfaktoren aus ihrer Gruppe haben sich in absteigender Reihenfolge BMP-2, 6 und 9 herausgestellt<sup>65</sup>, wobei diese drei Vertreter die Differenzierung zu Osteoblasten veranlassen und andere BMP weitere Reifungsprozesse initiieren. Im Wesentlichen beeinflusst BMP-2 die Differenzierung von induzierbaren mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten, die sich weiter zu Osteoblasten entwickeln<sup>66</sup>. Zusätzlich zur Osteoblastenstimulation erfolgt eine Stimulation reifer Osteoklasten mit BMP-Rezeptorexpression<sup>67</sup>. Die osteoinduktive Antwort ist dosisabhängig<sup>68</sup> und BMP-2 und BMP-7 können an ektope Orten Knochenbildung initiieren<sup>69</sup>. Obwohl es im Tierversuch für die embryonale Skelettbildung entbehrlich war<sup>70</sup>, ist BMP-2 notwendig für die Regulation der normalen Knochenmasse und hauptsächlich beteiligt an den ersten Schritten der Frakturheilung. Physiologisch nimmt die BMP-Produktion im Alter ab<sup>71</sup>. BMP-2 kontrolliert die eigene sowie die Entwicklung anderer BMPs<sup>72</sup> und ist darüber hinaus involviert in die Entwicklung von Herz<sup>73</sup>- und Nervenzellen<sup>74</sup>. Das BMP-2 Gen zeigt eine 100 prozentige Strukturhomologie zwischen verschiedenen Säugetierspezies und ist damit prädestiniert für die tierexperimentelle Erforschung.

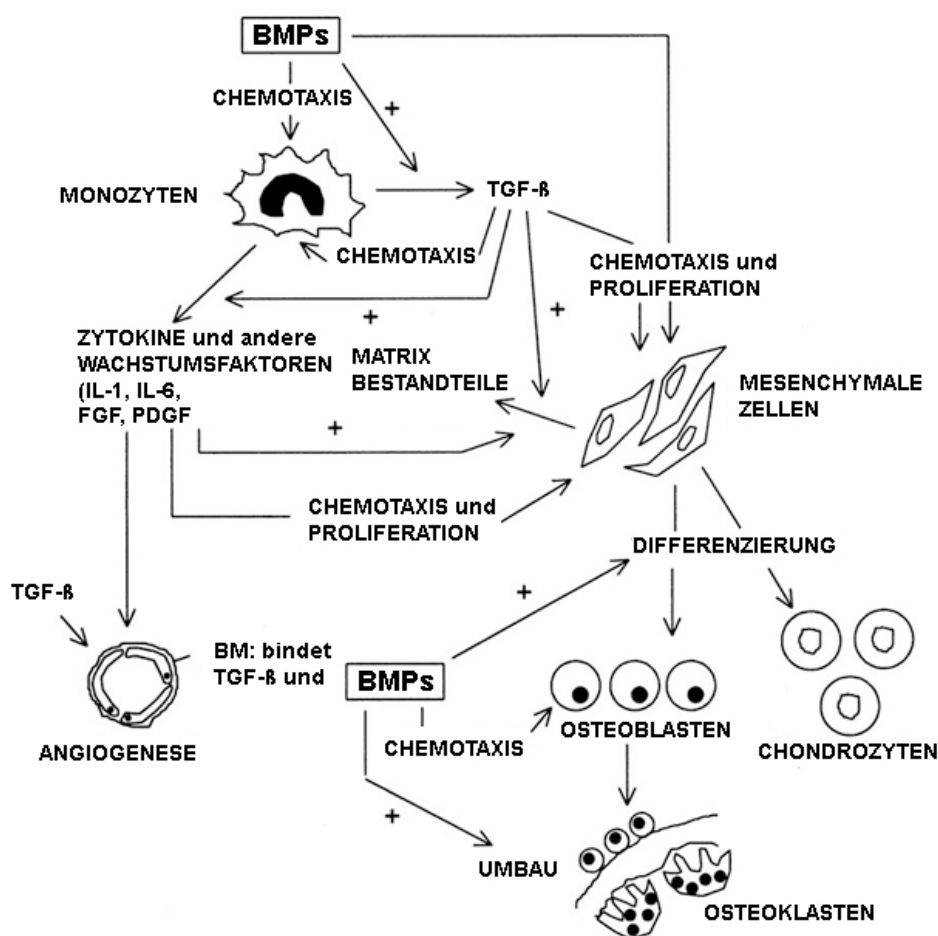


Abbildung 1: Zelluläre Wirkung von BMP und TGF-β (nach Termaat *et al.* 2005<sup>75</sup>, ©JBJS)

Proteine der BMP-Familie werden bereits seit 1988 rekombinant hergestellt. BMP-2 und BMP-7 sind in ihrer rekombinanten Form für die Behandlung von Pseudarthrosen<sup>76, 77</sup>, Wirbelkörperfusionen<sup>78, 79</sup> und offenen Tibiafrakturen<sup>77</sup> zugelassen. In den U.S.A., Europa und anderen Ländern wird rekombinantes BMP-2 Protein als INFUSE® (Medtronic Sofamor Danek, Memphis, U.S.A.) und InductOs® (Wyeth, Münster, Deutschland), rekombinantes BMP-7 als Osigraft® (Stryker Biotech, Hopkinton, U.S.A.) im klinischen Alltag verwendet. Bei offenen Tibiafrakturen konnte mit rekombinatem BMP-2 (rhBMP-2) eine schnellere Heilung, eine 44% Risikoreduktion bei Einheilungsversagen und weniger Infektionen erzielt werden<sup>77</sup>. Bei Wirbelkörperfusionen war rhBMP-2 der Applikation von autologem Knochenmark überlegen<sup>78</sup>, sowie bei lumbaler Arthrodesse effektiver und sicherer<sup>80</sup>. Rekombinantes BMP-7 erzielte in Studien mit Frakturen der langen Röhrenknochen gleiche

Ergebnisse wie die Applikation von autologem Knochenmark<sup>81</sup>. Die applizierten Proteine jedoch haben eine kurze biologische Halbwertszeit<sup>34</sup>, werden schnell abgebaut<sup>82</sup> und unter Umständen im gewünschten Gewebe nicht ausreichend resorbiert<sup>83</sup>. Wichtig ist eine lokale Konzentration, die lange genug im therapeutischen Fenster aufrechterhalten wird, um Osteoprogenitorzellen chemotaktisch anzulocken und die Differenzierung zu Osteoblasten zu gewährleisten<sup>84, 85</sup>. Bei der bisherigen Anwendung werden supraphysiologische Dosen des rekombinanten Proteins angewendet, die die bei der unbeeinflussten Knochenheilung auftretenden Konzentrationen deutlich übersteigen<sup>86</sup>.

### 1.3.5 Genterapie in der Knochenheilung

In den letzten 20 Jahren hat das fundamentale Verständnis der Mechanismen des Knochenumbaus enorm zugenommen. Dies hat bemerkenswerte Perspektiven eröffnet, um die klinischen Bedürfnisse nach neuen knochenaufbauenden Therapiemöglichkeiten erfüllen zu können. Der bisherige Goldstandard, die autologe Knochentransplantation, ist mit Risiken behaftet und auch nur begrenzt anwendbar<sup>87</sup>. Die Gabe rekombinanter Proteine stellt hierbei einen besonders hoffnungsvollen Ansatz dar, der jedoch aufwendig in der Herstellung und daher teuer im klinischen Einsatz ist. Das rekombinant hergestellte Protein muss aktiv, rein, sicher und biokompatibel sein und zum richtigen Zeitpunkt mit der richtigen Dosis am gewünschten Ort vorliegen. Der Ansatz des „controlled release“ hat bereits zu praktischen Anwendungen für den klinischen Alltag geführt<sup>88, 89</sup>. Dennoch konnten das Problem der kostspieligen Produktion und der Applikation bisher nicht adäquat gelöst werden. Einen vielversprechenden Ansatz bietet hier, wie in vielen anderen Gebieten der Medizin auch, die Genterapie.

Von Virchows Zellforschung ausgehend führte der Zuwachs an molekularem Grundverständnis von physiologischen und pathologischen Vorgängen im Körper zu der Idee, diese auf genetischer Ebene zu beeinflussen.

Genterapie ist die Einbringung von Genen in Zellen, um therapeutischen Nutzen aus der Expression und Funktion dieses Gens zu ziehen. Der erste Meilenstein auf dem Weg zur Genterapie war 1953 die Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA durch James Watson

und Francis Crick<sup>90</sup>. 1974 wurden zum ersten Mal eukaryontische Gene mittels bakteriellen Vektors kloniert<sup>91</sup>, wodurch Gene vermehrt und untersucht werden konnten. Drei Jahre später gelang die Entwicklung einer Technik zur Sequenzierung der DNA<sup>92</sup>. Die folgenden Anstrengungen, den genetischen Code weiter zu entschlüsseln und Gendefekte therapeutisch zu beeinflussen, führten 1993 zur weltweit ersten Gentherapie<sup>93</sup> mit der erfolgreichen Behandlung eines vierjährigen Mädchens, das an der angeborenen Immunschwäche ADA-SCID litt. Ein weiterer Erfolg stellte sich bei der Behandlung der Erbkrankheit Thrombangiitis obliterans 1996 ein<sup>94</sup>. Mit dem Tod des freiwilligen Probanden Jesse Gelsinger war 1999 der erste tragische Rückschlag der Gentherapie zu verzeichnen. Anfangs erfolgreich wurden in der SCID-X1 Studie acht Kinder therapiert<sup>95</sup>, von denen in den folgenden Jahren drei an Leukämie erkrankten. Seit 2003 wird das chinesische Gentherapie Produkt Gendicine zur Behandlung eines HNO-Tumors kommerziell vertrieben<sup>96</sup>. Neben der erwähnten Gentherapie sind Grundlagenforschung, die Entwicklung und Herstellung von Diagnostika und Arzneimitteln und, die DNA Diagnostik weitere Anwendungsbereiche für gentechnische Methoden. Bei den beschriebenen Gentherapien handelt es sich ausschließlich um die sogenannte somatische Gentherapie, bei der nur Körperzellen, die nicht der Keimbahn angehören, manipuliert werden und deren Effekt damit nicht vererbbar ist.

Die Gentherapie kann, wie schon angedeutet, auch neue Wege eröffnen um muskuloskeletale Erkrankungen zu behandeln. Mit der somatischen Gentherapie hatte man zunächst die Vorstellung, nur genetische Defekte zu therapieren. Optimal z.B. erschien das Therapieren eines singulären vererbten Gendefekts, wie er beispielsweise bei der Osteogenesis imperfecta, der sogenannten Glasknochenkrankheit, vorliegt. Gegenwärtig wird die experimentelle orthopädische Gentherapie aber vorwiegend dazu angewendet, Wachstumsfaktoren im Organismus durch Transfer der entsprechenden DNA zu den spezifischen Zellen selbst bilden zu lassen. Damit setzt man auf die Strategie, einen natürlich ablaufenden Prozess durch gezielte Expression eines Moleküls, das physiologisch an der Regeneration des Knochens beteiligt ist, zu induzieren oder zu beschleunigen<sup>34</sup>. Chris Evans führte die erste Gentherapiestudie am Menschen durch. Behandelt wurde die rheumatoide Arthritis mit einem Interleukin-I Rezeptor Antagonisten<sup>97</sup>. Weitere nicht-vererbte Krankheiten in der Orthopädie an denen gentherapeutische experimentell Ansätze erprobt werden, sind:



Arthrose<sup>98</sup>, fokale Knorpeldefekte<sup>99</sup>, aseptische Prothesenlockerung<sup>100</sup>, orthopädische Onkologie<sup>101</sup>, Reparatur von Bändern und Sehnen<sup>102</sup> und die Frakturheilung<sup>103</sup>.

### 1.3.6 Plasmide und Genvektoren

Die Idee Zellen zu transfizieren ist nicht sehr alt. Wolff et al. demonstrierten als erste, dass intramuskuläre Injektion von nackter Plasmid-DNA, kurzzeitig und in niedrigen Dosen, Genexpression induziert<sup>104</sup>. Durch die intensive Forschung der letzten Jahre ist heute der genetische Code vieler Wachstumsfaktoren bekannt. Wenn eine dieser genetischen Informationen *in-vivo* oder *ex-vivo* zugeführt werden kann, zellulär integriert und exprimiert wird, kann das resultierende Protein eine Alternative zur Verwendung der Proteine in Reinform sein. Über den Umweg der genetisch codierten Information wird die DNA hierbei in reiner Form oder als Plasmid (zirkuläre DNA) in einem transportierenden Vektor zu den Zellen geliefert<sup>105</sup>. Bei Verwendung von nicht-viralen Vektoren spricht man bei erfolgreicher Integration des Genmaterials in die Zielzellen von Transfektion; werden virale Vektoren eingesetzt, bezeichnet man den Prozess als Transduktion<sup>106</sup>. Der Herstellungsweg teilt sich in folgende Schritte auf: Identifikation des Gens (z. B. Wachstumsfaktoren), mit nachfolgender Isolierung des Gens und Umschreibung der Sequenz in cDNA (komplementäre DNA) und abschließender Klonierung in einen Expressionsvektor. Unterschieden wird, ob eine *in-vivo* Therapie mit direkter Applikation von Genmaterial stattfindet, oder eine *ex-vivo* Therapieform gewählt wird, bei der nach Isolation und Transfektion bzw. Transduktion von Körperzellen in der Zellkultur diese reimplantiert werden<sup>107</sup> (siehe Abb. 2 und 3).

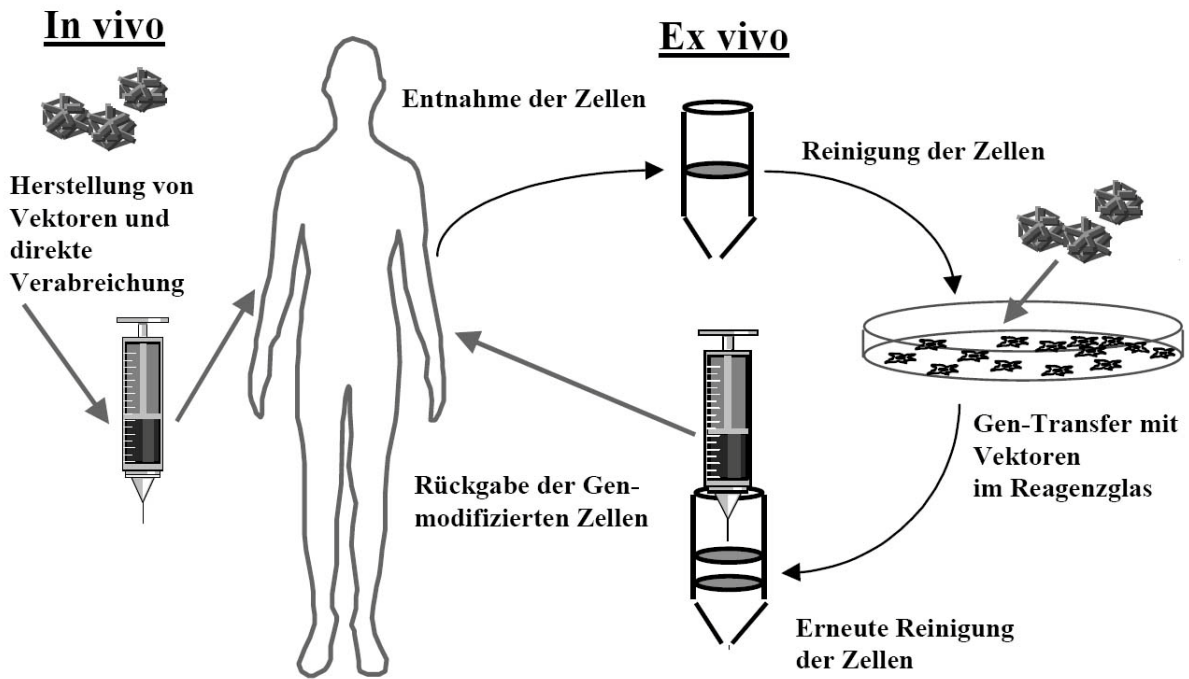


Abbildung 2: Verschiedene Möglichkeiten der Gentherapie (nach Hallek *et al.* 1999<sup>108</sup>)

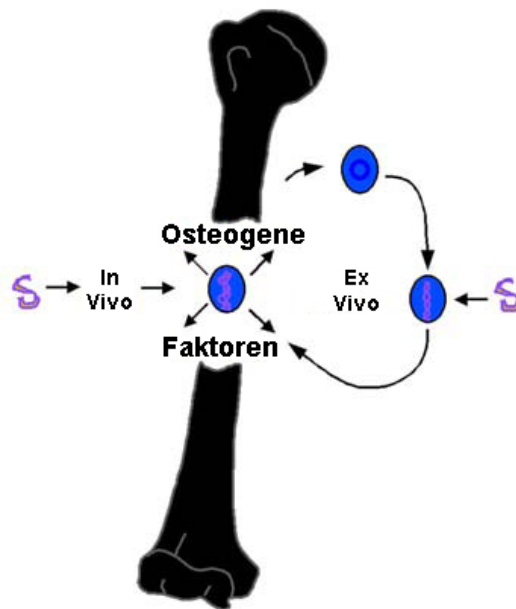


Abbildung 3: Gentherapie zur Beeinflussung der Knochenheilung (nach Betz *et al.* 2006<sup>109</sup>)

Der nicht-virale Genvektor (Vektor mit dem gewünschten Plasmid), auch als Transgen bezeichnet, verbleibt episomal, d.h. extrachromosomal im Zellkern, und wird nicht in das Wirtsgenom integriert. Das ist bei viralem Gentransfer nicht immer der Fall. Anschließend erfolgt der normale Weg einer Genexpression, die cDNA wird in mRNA transkribiert und anschließend in ein Protein translatiert. Entweder verbleibt das rekombinante Protein in der Zelle oder kann nach der Sekretion aus der Zelle wirksam werden. Für die therapeutische Gentherapie muss das Genprodukt über einen bestimmten Zeitraum von möglichst vielen Zellen gebildet werden. Die Effizienz ist bestimmt durch die Anzahl der transfizierten bzw. transduzierten Zellen.

Durch das Prinzip, die genetische Information anstelle des Wachstumsfaktors zu applizieren, kann lokal die Expression über einen langen Zeitraum mit hoher Konzentration erreicht werden<sup>110, 111</sup>. Auch gibt es Hinweise auf eine größere biologische Wirksamkeit der endogen produzierten Proteine im Gegensatz zu den zugeführten, rekombinanten Proteinen<sup>112, 113</sup>. DNA als stabiles Molekül hat eine lange Haltbarkeit und einfache Lagerung<sup>114</sup>. Die Herstellungskosten sind günstiger als bei rekombinanten Proteinen<sup>114, 115</sup>. Virale Vektoren sind durch die natürliche Selektion mit einem hoch entwickelten replikationskompetenten Mechanismus ausgestattet, der es ermöglicht DNA effizient zu transferieren<sup>116</sup>. Fraglich hingegen bleibt die Sicherheit der Transduktion. Potentielle virusassoziierte maligne Entartungen, die zum Tode führen können<sup>117</sup>, und mögliche hervorgerufene Immunreaktionen können auch zukünftig nicht ausgeschlossen werden. Trotz des biologischen Modells bleibt auch die Herstellung der Vektoren aufwendig und teuer<sup>118</sup>. Aufgrund der bisherigen experimentellen und klinischen Erfolge wird aber weiterhin eine große Bandbreite viraler Konstrukte erforscht<sup>116</sup>.

Non-virale Vektoren haben entscheidende Vorteile. Sie sind sicher, immunologisch weniger bedenklich, die Transfektion ist unabhängig vom Zellzyklus und sie sind leicht und günstig herzustellen<sup>119</sup>. Nachteilig wirkt sich allerdings immer noch eine geringe Transfektionseffizienz mit nur kurzer Genexpression aus<sup>105</sup>. Eine Methode des Transfers ist die Elektroporation, wobei mit elektrischen Impulsen die DNA in die Wirtszelle transportiert wird<sup>120</sup>. Die Idee einer „Genaktivierten Matrix“ (GAM) wurde von Fang et al. entwickelt<sup>115</sup> und wurde mittlerweile verbessert<sup>121</sup>. Ursprünglich wurden dabei BMP-4 Plasmid-DNA und Parathormon mittels Rinderknorpel in den Osteotomiespalt eines Rattenfemur gebracht. Hier

löst sich die DNA über die Zeit von einem Biomaterial, das vorher zielnah inkorporiert wurde. Das anschließend festgestellte anhaltende Expressionsprofil der osteoinduktiven Faktoren im Applikationsgebiet sprach für die erwünschte Verfügbarkeit der Faktoren<sup>115</sup>. Die Transfektionseffizienz war allerdings sehr gering. Die Steigerung der Effizienz konnte durch physikalische und chemische Modifikationen gesteigert werden. Endo et al.<sup>121</sup> modifizierten das GAM Modell mit Polyethylenimin (PEI), einem Bestandteil des COPROGs. Verglichen mit nackter DNA Applikation mittels Gerüst, induzierte das mit PEI kondensierte BMP-2 Plasmid mehr Knochenbildung. Verglichen mit der originalen GAM wurde in diesem Versuch sowohl eine Reduktion der applizierten Dosis, als auch der Behandlungszeit experimentell erreicht. Stellt man optimierte virale und nicht-virale Methoden einander gegenüber, zeigt sich bisher allerdings, dass die nicht-virale Transfektionseffizienz mit ca. 2% deutlich unter der viralen mit ca. 90%, liegt<sup>122</sup>. Die Einschulung und Kondensierung von DNA in Liposome ist eine weitere Lösung und wird im vorliegenden Versuch in einer neuen, weiterentwickelten Form angewendet. Bei einer vergleichenden Untersuchung zeigte der virale Vektor vermehrte Expression gegenüber dem nicht viralen, jedoch resultierten beide Techniken in suffizienter Knochenexpression<sup>123</sup>.

Nicht-virale Plasmide und Genvektoren haben das Potenzial, nützliche Instrumente der Medizin zu werden. Ohne das Wirtsgenom zu verändern, werden gezielt Proteine für eine begrenzte Zeit exprimiert. Systemisch applizierte Plasmidkomplexe werden jedoch im Falle vom nicht-viralen kationischen-Liposomenmodell bereits zu 65% schnell von Lunge und Leber aufgenommen und stehen als lokale Therapie nicht mehr zur Verfügung<sup>124</sup>.

### 1.3.7 Physiologische Barrieren der Gentherapie

Mittlerweile sind die vielen zu überwindenden physiologischen Barrieren der Gentherapie erkannt. *Extrazellulär*: Mit der initialen Immunantwort ist der Organismus bestrebt den Vektor nach *in-vivo* Applikation durch Opsonierung zu eliminieren. Serumprotease und –nukleasen vermindern weiter die biologische Aktivität<sup>125</sup> durch Beseitigung aus dem Blutstrom<sup>126</sup>. Vorwiegend bei viralen Vektoren zeigt sich bei Reapplikation eine stärkere Immunreaktion mit Aktivierung des Komplementsystems<sup>127</sup> durch vorangegangene

Antikörperbildung als nach der ersten Verabreichung<sup>128</sup>. Nicht zuletzt kann die überwiegend positiv geladene extrazelluläre Matrix dazu führen, dass die Ladung nicht-viraler Vektoren dissoziiert<sup>129, 130</sup>. *Intrazellulär*: Als Problem zeigt sich hier bereits die Zellmembran, die einen Durchtritt nach intrazellulär nur in Form von Membranfusion oder Endozytose zulässt. Zellstudien zeigen dass die Aufnahmekinetik dabei abhängig von Zelltyp und Partikelgröße ist<sup>131</sup>. Sind die Transgene intrazellulär mittels Endozytose angekommen, steht der Inkorporation in den Nukleus eine mögliche Umwandlung von Endosomen in Lysosomen bevor, wobei die DNA durch lysosomale Enzyme dekomponiert wird<sup>131, 132</sup>. Die erfolgreichere Strategie der Viren, aus den Endosomen nach intrazellulär zu gelangen, wurde in Versuchen kopiert<sup>133</sup>. Intrazelluläre Proteasen limitieren jedoch die Halbwertszeit der transgenen DNA bei *in-vitro* Injektion auf 50-90 Minuten<sup>134</sup>. Beschrieben wurde auch, dass der nukleozytoplasmatische Transport vom Nuclear Pore Complex (NPC) reguliert wird. Dabei können Moleküle, die kleiner als 10nm sind, passiv diffundieren, größere Moleküle dagegen sind auf den aktiven Transport angewiesen<sup>135</sup>.

Daraus ergeben sich drei Kriterien, die ein Applikationsprinzip von therapeutischen Genen (Transgenen) erfüllen muss: (1) Schutz der Transgene vor intrazellulären Nukleasen. (2). Transport der Transgene durch die Zellmembran in den Nukleus, ohne dabei (3) schädlich für den Organismus zu sein.

### 1.3.8 Copolymer Protected Gene Vectors - COPROGs

Wege zur Umgehung der beschriebenen physiologischen Barrieren sind aufgrund vielversprechender Zwischenergebnisse Gegenstand intensiver Forschung. Seit der Entdeckung, dass stark basische (kationische) Lipide DNA effektiv binden und DNA Transfer in Zellkulturen bewerkstelligen<sup>136</sup>, gab es viele Weiterentwicklungen dieser Methode<sup>137</sup>. Das Prinzip ist meist ähnlich: die identifizierte cDNA wird mit verschiedenartigen Makromolekülen komplexiert. Eine Neuentwicklung steht mit „*Copolymer Protected Gene Vectors*“ (COPROGs) als nicht-viralem Gen Vektor zur Verfügung. Bei diesem Verfahren wird die Plasmid DNA mit Polyethylenimin (PEI) zu einem positiv geladenen Komplex verbunden und anschließend mit einem Schutz-Polymer (*Protective Copolymer*, PROCOP,

bestehend aus Polyethylenglycol, PEG) umhüllt<sup>138, 139</sup> (siehe Abb. 4). PEG ist ein häufig in der Pharmazie verwendeter Wirkstoff der gut wasserlöslich und biokompatibel ist. Dieses Konstrukt begünstigt einen Schutz vor extrazellulärem Abbau und erleichtert eine intrazelluläre Aufnahme der Plasmide.

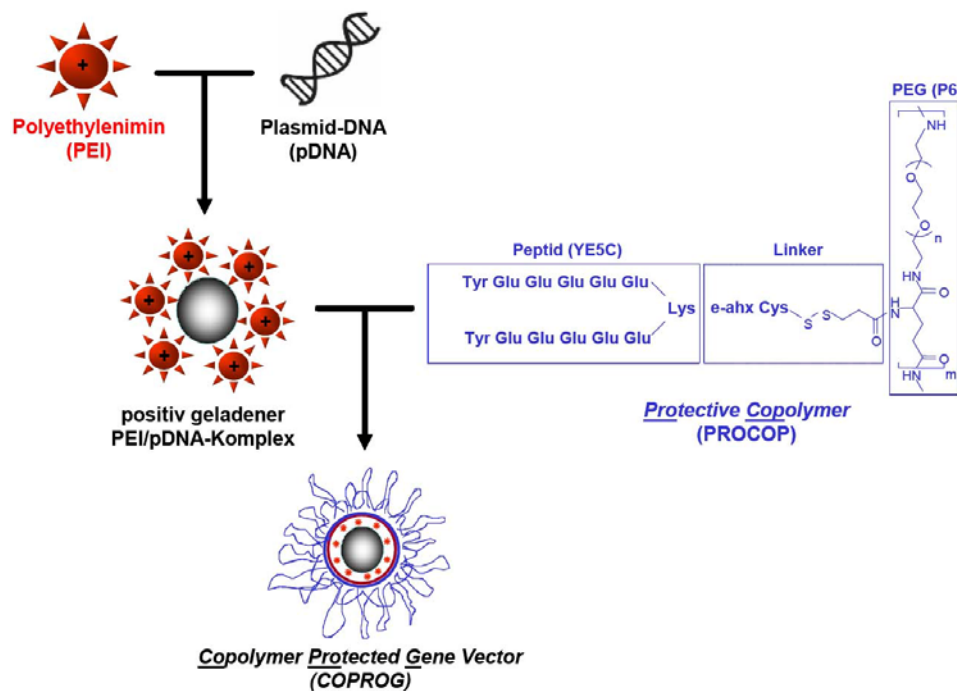


Abbildung 4: Bildung von „Copolymer Protected Gene Vectors“ aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen PEI/pDNA-Komplexen und negativ geladenen „Protective Copolymer“ (PROCOP) (nach D. Finsinger<sup>138, 140</sup>).

Das PROCOP schützt die DNA vor Opsonierung, Komplementaktivierung und Aggregatbildung durch Salze oder Serumalbumin. Das synthetische Polykation PEI führt zur Kompaktierung der DNA. Kompaktierung von DNA spielt sich auch physiologischer Weise in eukaryontischen Zellen und Viren ab. Beschrieben ist auch, dass Kompaktierung die DNA stabilisiert und vor Nukleasen schützt<sup>141</sup>. Schätzungen zufolge kollabieren die Komplexe zu einem DNA Molekül pro Partikel PEI<sup>142</sup> und können mit einer Größe von weniger als 50nm endozytiert werden<sup>138</sup>. Die „Protonenschwamm“- Hypothese ist eine gängige Erklärung zum

PEI basierten Gentransfer. Unter physiologischen pH-Werten sind die Amingruppen von PEI nicht vollständig protoniert. Im endosomalen Kompartiment bieten sie eine Pufferkapazität. Durch Eintritt von  $H^+$ -Ionen sowie  $Cl^-$  als Gegenionen steigt der osmotische Druck, was zum Anschwellen und schließlich zur Ruptur des Endosoms führt<sup>143-145</sup> und die DNA nach intrazellulär entlässt (siehe Abb. 5). Damit wird auch der lysosomale Abbau der DNA verhindert. Die Ergebnisse von Finsinger et al. zeigen, dass die Vektor-DNA durch die „PROCOPs“ *in-vivo* vor der Interaktion mit dem Komplementsystem und der Opsonierung geschützt sind<sup>138, 139</sup>. Weitere Versuche belegen, dass Kollagenschwämme *in-vitro* mit „CORPOGs“ und kolonisierenden Zellen beladen sowie *in-vivo* subkutan implantiert zur Übertragung genetischer Information genutzt werden können<sup>146</sup>. Wurde Fibrinkleber als Überträgermatrix anstelle des Kollagenschwamms genutzt, konnten auch Fibroblastenkulturen transfiziert werden<sup>147</sup>.

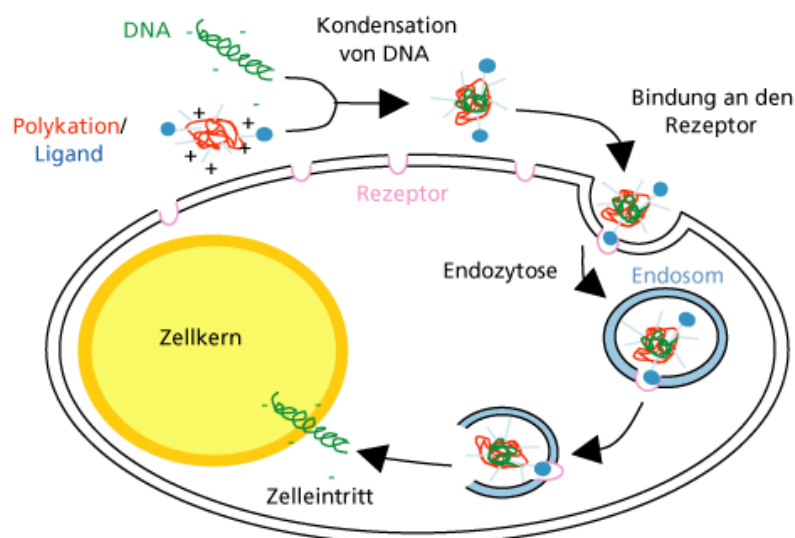


Abbildung 5: Zellulärer Mechanismus der DNA Aufnahme

### 1.3.9 Trägermaterial Fibrin

Zahlreiche Trägermaterialien werden zur lokalen Applikation von Wirksubstanzen verwendet und erforscht<sup>148, 149</sup>. Versuchsweise und klinisch angewendete Trägermaterialien zur genterapeutischen BMP-2 Plasmid Applikation sind *natürliche Polymere, anorganische Materialien und synthetische Polymere*. *Natürliche Polymere* wie Fibrinogen bzw. Fibrinkleber<sup>150</sup>, Kollagene<sup>151</sup>, Hyaluron und viele andere. Sie sind gut biokompatibel und resorbierbar und haben den Vorteil, in viele Konfigurationen mit variablen Verweilzeiten im Gewebe formuliert werden zu können. Auch können chemische Modifikationen die *in-vivo* Eigenschaften beeinflussen. Nachteilige Aspekte sind die Beschaffung, die mögliche Immunogenität und die Krankheitsübertragung. So ist das Trägermaterial für die klinisch zugelassenen rekombinanten BMP Proteine zum Beispiel bovines Kollagen Typ-I<sup>152</sup>. *Anorganische Materialien* zur Applikation bestehen häufig aus Calciumphosphat in einer Zementzubereitung<sup>153</sup>. *Synthetische Polymere*<sup>154</sup> werden häufig für die Gewebekonstruktion verwendet und beinhalten die Polylactide<sup>155</sup>, Polyglykoxide und deren Kopolymere wie PLGA (Polylactid-co-Glycolid), das am häufigsten synthetisierte Polymer.

Bei der Blutgerinnung ist Fibrin das vernetzende Protein, welches unter Mitwirkung von Thrombin aus der Vorstufe Fibrinogen gebildet wird und die Wunde als Polymer verschließt. In vielen Bereichen der Chirurgie findet der Fibrinkleber, der sich vom physiologischen Protein ableitet und hauptsächlich aus humanem Fibrinogen-Lyophilisat, Thrombin, Faktor VIII und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besteht, Anwendung<sup>156</sup>. Er dient dem Verschluss oder der Abdichtung von Geweben, dem Zusammenfügen kleinerer Knochenfragmente, der Spongiosaauffüllung sowie bei diffus auftretenden Blutungen der Hämostase, so beispielsweise in der Orthopädie<sup>157-159</sup>, der plastischen Chirurgie<sup>160</sup> oder der Viszeral- und Gefäßchirurgie. Es konnte gezeigt werden, dass Fibrinkleber bei der Implantation von Kniegelenksendoprothesen die Blutungsneigung senken kann<sup>159</sup>. Weiter sind osteoinduktive Eigenschaften des Fibrinklebers beschrieben<sup>161, 162</sup>. Die Eignung auch als Trägermaterial bioaktiver Substanzen wurde in Studien bestätigt<sup>163</sup>, wie auch die Anwendung als Transfektionsmedium<sup>164</sup>, unter anderem auch für BMP-2<sup>150</sup>. Fibrinkleber kann also bei Eingriffen am Knochen die intramedulläre Blutungsneigung verringern und als Trägermaterial für Plasmide oder rekombinante Proteine dienen, welche die ossäre Integration des Implantats verbessern sollen (siehe Tab. 1).



**Tabelle 1: Biologische Modelluntersuchungen mit Fibrinformulierung**

Fibrinformulierung	Biologisches Modell	Referenz
Kleber	Zahnschmelz bei Hunden	Ren et al. 1999 <sup>165</sup>
Kleber	Knorpelläsion bei Ratten	Gelse et al. 2003 <sup>166</sup>
Kleber	<i>in-vitro</i> Studie	Schillinger et al. 2004 <sup>167</sup>
Matrix	Kaninchen, Hunde, Katzen, Ratten: verschiedene Knochendefekte	Schmoekel et al. 2004 <sup>168</sup> , 2005 <sup>169</sup>
Kleber, PCL-Gerüst	<i>in-vitro</i> Studie	Rai et al. 2005 <sup>170</sup>
Matrix	<i>in-vitro</i> Studie, Evaluation verschiedener Trägermaterialien	Xu et al. 2005 <sup>171</sup>
Fibrin/Fibronectin mit beta-TCP	Schädeldefekt bei Ratten	Hong et al. 2006 <sup>172</sup>
Kleber	Ektope Knochenbildung bei Mäusen	Zhu et al. 2006 <sup>173, 174</sup>
Kleber	Frontaler humaner Knochendefekt	Arnander et al. 2006 <sup>175</sup>
Kleber	Wirbelkörperperfusion bei Ratten	Patel et al. 2006 <sup>176, 177</sup>
Kleber	Wirbelkörperperfusion beim Kaninchen	Lee et al. 2006 <sup>178</sup>
Matrix, CAM	<i>In-vitro</i> Studie	Smith et al. 2007 <sup>179</sup>
Gel	Schädeldefekt bei Ratten	Chung <sup>180</sup> 2007
Kleber	Sehnen-Knochenübergang Kaninchen	Kim <sup>181</sup> 2007
Kleber	Knochenmark vom Kaninchen	Cui et al. 2007 <sup>182</sup>

Gelse et al. nutzten adenoviral mit BMP-2 transduzierte Zellen in einer Fibrinkleber-Suspensionen als eine flexible Matrix für die lokale Applikation in Knorpeldefekte und erreichten Knorpelreparatur<sup>166</sup>. Patel et al. beschreiben in einer neueren Studie, dass Fibrinkleber die rhBMP-2 Applikation bei der Wirbelkörperperfusion kontrolliert; durch Limitierung der Diffusion in den Spinalkanal, Knochenwachstumsstimulation und kontrollierte Applikation<sup>176</sup>. Hubbell und Schmoekel wendeten in Studien bei verschiedenen

Tiermodellen ein nichtglykosiliertes BMP-2, mit dadurch herabgesetzter Löslichkeit und verzögerter Freisetzung an, das in eine Fibrinmatrix inkorporiert wurde<sup>168, 169, 183</sup> und erzielten gute Knochenheilung. Eine weitere Modifikation des BMP in einer Arbeit der Gruppe erhöhte die Bindung von BMP-2 zum Trägermaterial<sup>169</sup>. Gute experimentelle Ergebnisse gelangen Han et al. mit einer Fibrinverbindung als Träger für rhBMP-4<sup>184</sup>, Hong et al.<sup>172</sup> und Ren et al. mit rhBMP-2<sup>165</sup>. Ähnliche Ergebnisse stammen aus der Gruppe Rai et al., die zur Testung von pharmakologischen Trägersystemen Fibrin als Bindungsstoff für rhBMP-2 erfolgreich verwendeten<sup>170</sup>. Wurde Fibrinkleber als Trägermaterial für eine Stammzell-BMP-2 Mischung verwendet, konnte von Zhu et al eine vermehrte Knochenbildung festgestellt werden<sup>174</sup>. Lee et al. konnten nur Knochenbildung feststellen, wenn die BMP-2 transduzierten Zellen bei der Wirbelkörperperfusion mittels Fibrinkleber appliziert wurden<sup>178</sup>. Bei Chung et al. zeigte sich eine rhBMP-2 beladener Fibrinringel Komplex der einfachen BMP-2 Applikation überlegen<sup>180</sup>. BMP-2 im Fibrinkleber suspendiert zeigte in der Gruppe von Kim et al. bei der experimentellen Therapie eines Achillessehendefekts gute biomechanische und histologische Resultate<sup>181</sup>. Einen komplexen neuen Ansatz brachten Smith et al. auf, die ein Fibrinkonstrukt kombiniert im chick chorioallantoic membrane (CAM) Assay als Trägermaterial für rhBMP-2, VEGF und FGF-2 verwendeten. Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Einsprossung von Blutgefäßen in das experimentelle Gerüst. In einer klinischen Anwendung von Arnander et al. wurde Fibrin als Trägermaterial des rhBMP-2 erfolgreich zur partiellen Rekonstruktion eines Os temporale Defekts verwendet<sup>175</sup>. In einem *in-vitro* und *in-vivo* Vergleich verschiedener Trägersysteme konnten Xu et al. allerdings die vielen positiven Berichte von Fibrinzubereitungen in ihrer *in-vitro* Testung mit BMP-2 transduzierten Knochenmarkstammzellen nicht reproduzieren. Die BMP-2 Produktion war im Vergleich verschiedener Trägersysteme mit Fibrin am niedrigsten<sup>171</sup>.

Weitere Untersuchungen über die genaue Interaktion von BMP-2 mit der extrazellulären Matrix und Fibrin stammen von Hubbell et al. Ihre Versuche zeigten, dass Faktoren die von Zellen in der Fibrinmatrix sezerniert werden, von dieser unter den physiologischen Bedingungen der Gewebsreparatur nicht gebunden werden<sup>185</sup>. Dies ist erstaunlich, da Zellen, die primär den Fibrinkoagel bilden, viele Wachstumsfaktoren sezernieren<sup>186</sup>. Gegensätzlich dazu konnte die Gruppe zeigen, dass die an der Gewebsreparatur unbeteiligte extrazelluläre Matrix eine höhere Affinität zu Wachstumsfaktoren besitzt.

## **1.4 Ziel und Hypothesen**

### **1.4.1 Ziel des Versuchsvorhabens**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Implantateinheilung unter der lokalen Applikation von Plasmiden, die für den Wachstumsfaktor Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) kodieren, mit einem neu entwickelten non-viralen Vektor mittels Fibrinkleber als Trägermaterial *in-vivo*. Der Einfluss der lokalen Gentherapie auf die Implantatintegration wird im Kaninchenmodell anhand der biomechanischen Festigkeit des Implantats in der Tibia des Tieres untersucht.

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

### **1.4.2 Hypothese des Versuchsvorhabens**

Aus dem oben genannten ergibt sich folgende Hypothese:

Durch die Applikation von BMP-2 als Plasmid mittels Fibrinkleber kommt es bei der Einheilung des Implantats zu einem verbessertem Knochen-Implantat Kontakt, messbar durch die gesteigerte biomechanische Festigkeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

74, im Durchschnitt ca. 8 Monate alte, männliche New Zealand White Rabbits wurden operiert. Eine Reduktion der Versuchstierzahl wurde durch beidseitiges Operieren der Tibia für jeweils histologische und biomechanische Auswertung erwirkt. Die Untersuchung der Hypothese erfolgte in einer prospektiv, randomisierten Studie. In einem Vorversuch wurden 10 Tiere zur Prüfung und Etablierung der Operationsmethode und der biomechanischen und histologischen Auswertung verwendet. New Zealand White Rabbits werden häufig bei Studien über den Knochenstoffwechsel und die Implantateinheilung verwendet. Die Tiere wurden speziell für die Forschung gezüchtet (Harlan Winkelmann GmbH, D-33178 Borcheln). Die Behandlung der Tiere erfolgte unter tierärztlicher und tierpflegerischer Obhut artgerecht in Einzelkäfigen in klimatisierten Räumen (Raumtemperatur etwa 20°C) mit Fenstern in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Berlin. Den Tieren stand Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Jedes Tier wurde vor dem Eingriff auf körperliche Gesundheit untersucht. Der entsprechende Tierversuchsantrag wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt. (Reg. Nr. G 0010/05).

Die Tiere wurden in 6 Gruppen aufgeteilt. Mittels anterograder Bohrung wurde den Tieren ein Titannagel mit oder ohne Plasmidformulierung in beide Tibiae implantiert. 28 oder 56 Tage postoperativ fand die Tötung mit anschließender biomechanischer bzw. histologischer Untersuchung statt.

Diese tierexperimentelle Studie wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (SCHM 1436/5-1).

## 2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsplanung

Die 64 Tiere für den Hauptversuch wurden erst zufällig mit einer Zahlencodierung versehen und dann randomisiert einer Gruppe zugeteilt.

Bei 16 Tieren wurden die Tibiae beidseits mit einem intramedullären titanelastischen Nagel (TEN) ohne Zusatz von Fibrin oder Plasmiden versorgt. Sie dienten als erste Kontrollgruppen (Gruppe Ia – Standzeit 28 Tage und Ib – Standzeit 56 Tage). Bei einer weiteren Kontrollgruppe mit 16 Tieren wurde zusätzlich zum Titannagel Fibrinkleber appliziert (Gruppe IIa, b). In der eigentlichen Versuchsgruppe wurde den 16 Kaninchen zusätzlich zum Fibrinkleber die zu testende Plasmidformulierung hinzugefügt (Gruppe IIIa, b). Alle Tiere wurden beidseitig operiert und die Tibiae biomechanisch bzw. histologisch getestet. Es gab drei Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, den Operationstag, sowie die Tage 28 und 56, an denen vor der eigentlichen Testung eine Blutentnahme sowie konventionelles Röntgen durchgeführt wurde.

Zur Sicherheits- und Transfektionsuntersuchung wurden 16 weitere Tiere operiert, mit Fibrin und Luciferase-Plasmid behandelt (Gruppe IV a-d) und je 4 Tiere am Tag 3, 7, 28 und 56 getötet und die Tibiae sowie die Organe Leber, Niere, Gehirn, Milz, Lungen, Muskel, Hoden und Fettgewebe zum Transfektionsnachweis aufgearbeitet.

Eine schematische Übersicht ist in der Tabelle 2 zu finden.

Die histologische Aufarbeitung sowie der Transfektionsnachweis sind Bestandteile weiterer Promotionsarbeiten.

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung und Versuchsplan**

Gruppen	Implantat	Tag 1 (OP)	Tag 28	Tag 56
Kontrolle I a (n8)	Titanimplantat	Röntgen Blutentnahme	Röntgen, Blutentnahme, Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>	Röntgen, Blutentnahme, Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>
Kontrolle I b (n8)	Titanimplantat	Röntgen Blutentnahme		
Fibrin II a (n8)	Titanimplantat+ Fibrinkleber	Röntgen Blutentnahme	Röntgen, Blutentnahme Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>	Röntgen, Blutentnahme, Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>
Fibrin II b (n8)	Titanimplantat+ Fibrinkleber	Röntgen Blutentnahme		
BMP III a (n8)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG	Röntgen Blutentnahme	Röntgen, Blutentnahme Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>	Röntgen, Blutentnahme Tötung, <b>Biomechanik,</b> <b>Histologie</b>
BMP III b (n8)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG	Röntgen Blutentnahme		
Reporterger IV a (n4)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG +Reporterger	Röntgen Blutentnahme	Tag 3 Luciferasetest	Tag 28 Luciferasetest  Tag 56 Luciferasetest
Reporterger IV b (n4)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG +Reporterger	Röntgen Blutentnahme	Tag 7 Luciferasetest	
Reporterger IV c (n4)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG +Reporterger	Röntgen Blutentnahme		
Reporterger IV d (n4)	Titanimplantat+ Fibrinkleber+COPROG +Reporterger	Röntgen Blutentnahme		

## 2.3 Implantat

Als Implantate dienen titanelastische Nägel (TEN, Synthes™ GmbH, Solothurn, Schweiz) der Stärke 2,54mm.

## 2.4 Fibrinkleber

Der verwendete Fibrinkleber Tissucol® (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) ist ein häufig zur klinischen Anwendung kommender Zweikomponenten-Fibrinkleber. Dieser besteht zum einen aus lyophilisiertem Fibrinogen mit Aprotinin als Lösungsmittel, zum anderen aus lyophilisiertem Thrombin mit Calciumchlorid als Lösungsmittel. Er imitiert die natürliche Fibrinbildung im Wundgebiet durch gemeinsame Aushärtung der beiden Komponenten. Die Mischungsverhältnisse sowie die Verdünnung der Thrombin-Lösung erfolgte nach Herstellerangaben.

## 2.5 Plasmid

Zur lokalen Applikation des BMP-2 - Plasmids (siehe Abb. 6) wurde ein neu entwickelter nicht-viraler COPROG (**C**opolymer **P**rotected **G**ene) Vektor verwendet. Dieser wurde von der Arbeitsgruppe um Stemberger und Plank (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt. Pro Applikationseinheit waren 200µg COPROGs, bestehend aus PEI (Polyethylenimin) und P6YE5C (Hüllpolymer) plus 84µg Plasmid BMP-2 DNA, enthalten. Die als Lyophilisat gelieferten Einheiten wurden unmittelbar präoperativ in 0,21ml destilliertem Wasser mit einer Temperatur von 37° C rehydriert.

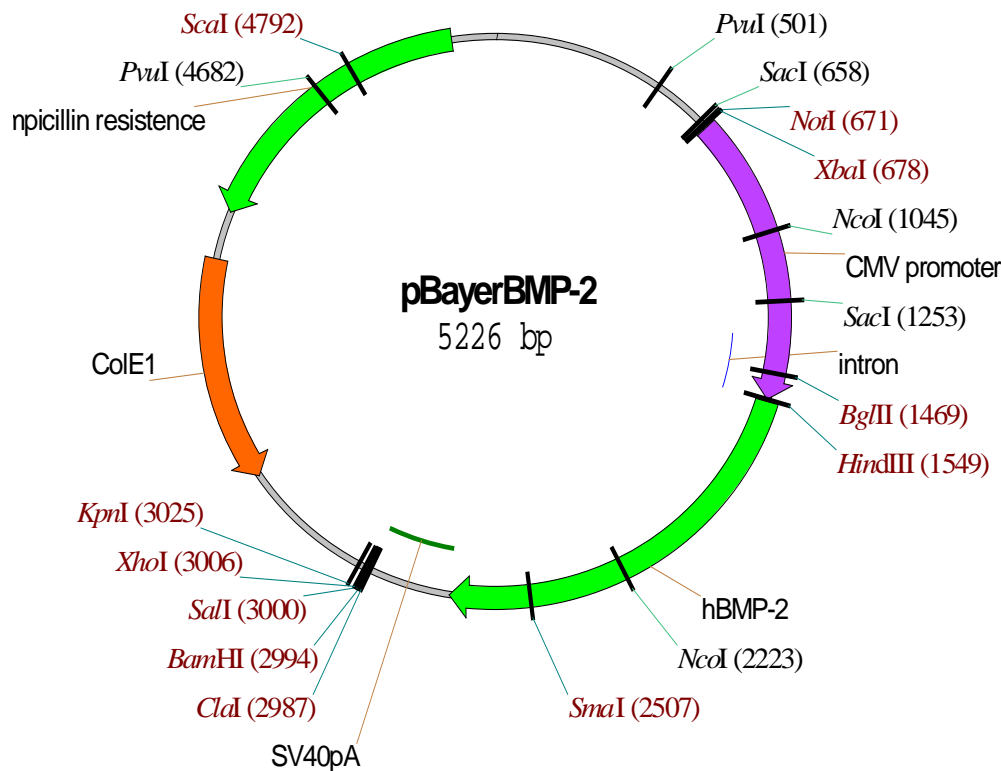


Abbildung 6: Struktur des BMP-2 Plasmids

## 2.6 Operatives Vorgehen

Die Anästhesie der Tiere erfolgte nach anerkannten und erprobten Standardprotokollen. Vor Beginn der Operation wurde die rektale Messung der Körperkerntemperatur mit einem digitalen Thermometer (Paul Hartmann LTD., Heywood, U.K.) durchgeführt. Dann wurden die Tiere durch eine intramuskuläre Injektion mit einer gewichtsadaptierten Dosis Domitor<sup>®</sup> (0,04 mg/kg KG) (Medetomidinhydrochlorid, Pfizer Animal Health, New York, USA) sowie Ursotamin<sup>®</sup> (90 mg/kg KG) (Ketaminhydrochlorid, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) prämediziert. Anschließend erfolgte präoperativ die gründliche Rasur beider zu operierender Beine, wobei zusätzlich Enthaarungscreme (Veet, Thioglykolsäure, komm.passion, Düsseldorf, Deutschland) verwendet wurde (siehe Abb.7). Zum Schutze der Augen wurden diese während der Operation mit Bepanthen<sup>®</sup> Augensalbe (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) feucht gehalten. Als Hypothermieprophylaxe fand ein Heizgerät, Thermomaquet (Stierlen-Maquet, Rastatt, Deutschland) Anwendung. Die Tiere wurden mit



einem 2,5er Magill-Tubus (Rüsch, Böblingen, Deutschland), bestrichen mit Xylocain-Gel 2% (Lidocain-HCL, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) intubiert (siehe Abb.8). Die perioperative Narkose wurde mittels Isofluran (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether, Forene<sup>®</sup>, Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) und Sauerstoff aus einem Narkosegerät, Dräger Sulla 800 V (Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, Deutschland) aufrechterhalten. Als Analgesie wurde präoperativ Temgesic<sup>®</sup> (Buprenorphinhydrochlorid gewichtsadaptiert; Essex Pharma, München, Deutschland) intramuskulär injiziert. Als Antibiotikum diente subcutan verabreichtes Baytril<sup>®</sup> (Enrofloxacin; Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland).

Das operative Vorgehen erfolgte nach den herkömmlichen sterilen Regeln. Die zu operierenden Hinterläufe wurden zunächst steril mit Braunol<sup>®</sup> (B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen) abgewaschen und anschließend steril abgedeckt (siehe Abb.9). Mit einem Einmalskalpell (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan) wurde der Hautschnitt knapp medial der Tuberositas tibiae gesetzt (siehe Abb.10).

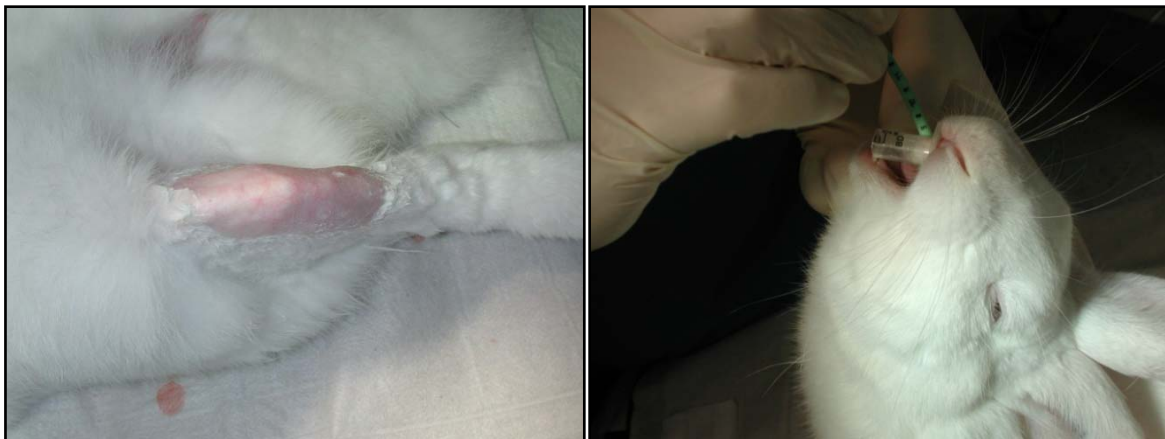
Nach gründlicher Freipräparation mit Präparierschere, chirurgischen- und anatomischen Pinzetten bis auf den Knochen wurde medial der Tuberositas tibiae die Markhöhle der Tibia mit einem Handbohrer ( $\varnothing$  2,0 mm, Aesculap AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen) anterograd eröffnet. Darauf folgte mit Bohrern aufsteigenden Durchmessers ( $\varnothing$  2,5 mm; 2,8 mm) die Vorbohrung des Markraums (siehe Abb.11). Je nach Versuchsgruppe wurde nun der Nagel eingebracht, bzw. zuvor der Markraum mit Fibrinkleber mit oder ohne Plasmidformulierung aufgefüllt (ca. 0,4 ml) (siehe Abb.12).

Als Implantat diente ein elastischer Nagel aus Titan (siehe oben), welcher intraoperativ mit einem Seitenschneider auf die passende Länge gebracht wurde. Angestrebt wurde ein Sitz des Implantats von unmittelbar proximal des oberen Sprunggelenks bis kurz unter den Zugang zum Markraum im Tibiakopf reichend (siehe Abb. 15). Abschließend wurde die Wunde schichtweise mit einem Ethicon Vicryl 3-0 Faden (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A.) verschlossen (siehe Abb.12). Die genähte Wunde wurde zusätzlich mit einem Sprühverband versehen (Pansement Spray, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland). Nachdem ein Hinterlauf operiert war, wurde der andere der gleichen Behandlung unterzogen.

Postoperativ wurden die Tiere erneut analgetisch mit einer Einmaldosis Temgesic® (Buprenorphinhydrochlorid; Essex Pharma, D-81703 München) sowie antibiotisch mittels subcutan verabreichtem Baytril® (Enrofloxacin; Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) versehen.

Noch in sediertem Zustand erfolgte eine Blutentnahme von jeweils 0,5 ml in Serum- und Blutbildröhrchen (beide Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) mittels Haematokritkapillaren (75mm / 60µl Brand, Wertheim, Deutschland) sowie Gewichtsmessung (Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Die Blutabnahme erfolgte aus einer peripheren Vene am Ohr der Kaninchen. Im abgenommenen Blut wurden zum Status und zur Verlaufskontrolle Standardlaborparameter bestimmt.

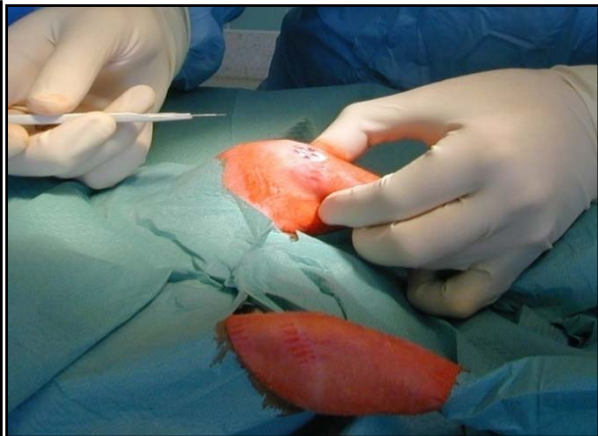
In anfangs täglichen, später wöchentlichen Abständen wurde der klinische postoperative Verlauf der Tiere beobachtet. Dies beinhaltete insbesondere Wundinspektion sowie Hinweise auf Verhaltensänderungen bzw. körperliches Erscheinungsbild.



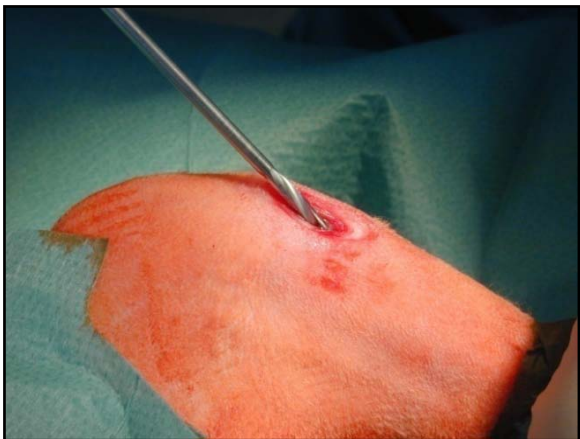
**Abbildung 7: Scheren und Enthaaren der Tibia**    **Abbildung 8: Intubation**



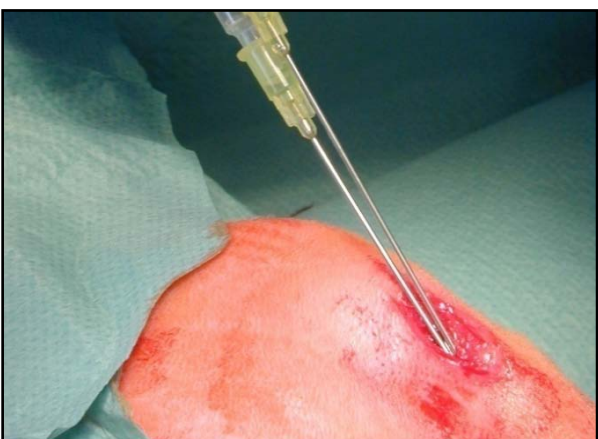
**Abbildung 9: Steriles Einpacken**



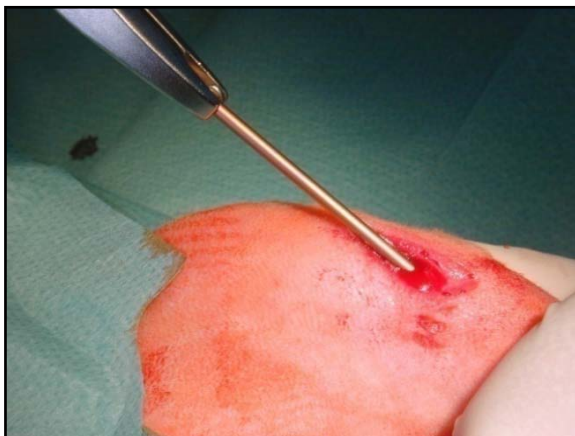
**Abbildung 10: Hautschnitt**



**Abbildung 11: Vorbohren des Markraums**



**Abbildung 12: Applikation in den Markraum**



**Abbildung 13: Implantation des Titannagels**



**Abbildung 14: Hautnaht**

## 2.7 Radiologische Untersuchung

Die gesamte Implantationsphase des TENs fand unter Bildwandlerkontrolle (Siemens Siremobil Iso C mit Siemens Monitor N44, Siemens AG, München, Deutschland) statt. Postoperativ wurden konventionelle Röntgenbilder in zwei Ebenen auf Digitalkassetten (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan) mit einem mobilen Röntgengerät angefertigt (Mobilett Plus, Siemens AG, München, Deutschland). Das operierte Bein wurde in zwei Ebenen (lateral und p.a.) geröntgt (siehe Abb. 15). Die Aufnahme wurde mit einem standardisierten Film-Fokus-Abstand von 60cm, 1,8mAs Belichtungszeit und 52kEV Strahlenhärte durchgeführt. Die Abschlusskontrollaufnahme am 28. oder 56. postoperativen Tag (Tötungstag) wurde am freipräparierten Knochen vorgenommen. Die Bilder wurden von drei verschiedenen Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Bewertungskriterien waren die korrekte Lage des Implantats, das Vorhandensein von Entzündungszeichen wie Ringsequestern oder Osteolysen, und eventuell vorhandene Lockerungszeichen wie z.B. ein vorhandener Lockerungsraum.

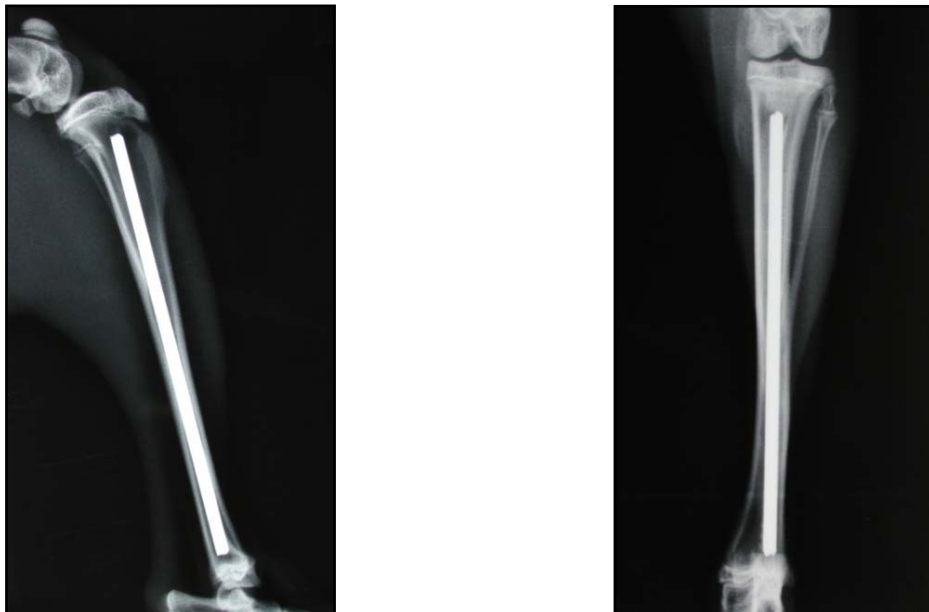


Abbildung 15: Röntgen seitlich und p.a.

Zur Auswertung der radiologischen Bilder wurden die Tibiae zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten an festgelegten Messpunkten ausgemessen und anschließend individuell und interindividuell verglichen. Zu bestimmende Parameter der Tibia waren Gesamtlänge, maximale proximale sowie distale Breite und minimale diaphysäre Breite. Die Messungen erfolgten mittels digitalen Messschiebers. Die Begutachtung erfolgte an einem Bildanalysesystem.

## **2.8 Biomechanische Untersuchung**

### **2.8.1 Knochenentnahme**

Die Kaninchen wurden zu Beginn durch eine intramuskuläre Injektion von Domitor<sup>®</sup> (Medetomidinhydrochlorid, Pfizer Animal Health, USA, 10017 New York) und Ursotamin<sup>®</sup>, (Ketaminhydrochlorid 10%, Serumwerk Bernburg AG, D-06406 Bernburg) analgosediert. Daraufhin erfolgte eine abschließende Blutentnahme mit Bestimmung derselben Parameter wie am Tag der Operation. Anschließend wurden die Kaninchen durch Thiopental (Trapanal<sup>®</sup>, ALTANA Pharma, D-78467 Konstanz) und eine Überdosis Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45% Braun<sup>®</sup>, Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen) getötet. Die Entnahme der Tibiae wurde durch einen langen Hautschnitt vom distalen Femur bis zum oberen Sprunggelenk vorbereitet. Die vorsichtige Bergung des Knochens geschah mittels Exartikulation am Kniegelenk und am oberen Sprunggelenk. Nach Entnahme wurde die Tibia sorgfältig unter Knochenschonung vom Weichteilgewebe freipräpariert. Mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Kompressen dienten als Transportverpackung zu einer zeitnahen biomechanischen Testung.

### **2.8.2 Knochenvorbereitung**

Die rechte oder linke Tibia eines Tieres wurde randomisiert ausgewählt, um für die biomechanische Untersuchung verwendet zu werden. Die kontralaterale Tibia wurde zeitgleich zunächst in einer Formalinlösung fixiert, um sie der Aufbereitung zur

histomorphologischen bzw. histomorphometrischen Untersuchung zuzuführen (siehe Kapitel 2.9 Histologische Untersuchung).

Im ersten Arbeitsschritt wurde mit einem Feinwerkzeug (Dremel<sup>®</sup> 300 Series, Dremel D-70745 Leinfelden-Echterdingen) und Mini-Trennscheibe die Kortikalis um das Implantat proximal sowie distal zirkulär angesägt. Die Höhe der Ansatzpunkte wurde anhand der auf den Röntgenaufnahmen lokalisierten Implantatenden gesetzt. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, das Implantatmaterial nicht zu berühren. Im nächsten Schritt wurde der Knochen mit einer Knochenzange (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) von den Diaphysen her bis zum angesägten Ring abgetragen. Auch hier durfte das Implantat nicht von dem Werkzeug berührt oder indirekt gelockert werden. Nun waren die Implantatenden freigelegt. Im letzten Schritt vor der eigentlichen Testung konnte der Knochen nun in eine für diesen Versuch modifizierte (nach einer Vorarbeit aus der Arbeitsgruppe) biomechanischen Testvorrichtung eingesetzt werden. Die Länge des nach der Vorbereitung verbliebenen Tibiaknochens wurde mit einer Schieblehre gemessen, um später in die biomechanische Berechnung mit einbezogen werden zu können. (siehe Kapitel 2.8.5 Auswertung)

### **2.8.3 Knocheneinbettung**

Vor der eigentlichen Testung musste der Knochen in eine Position lotrecht zur Arbeitsachse und Prüfkraft der Zwick<sup>®</sup> Materialprüfmaschine 1455 (Zwick, Ulm, Deutschland) gebracht und dort fest eingebettet werden, um ein achsengerechtes Herausdrücken des Implantats aus dem Knochen ohne seitliche Biegekräfte zu gewährleisten. Diese Kriterien wurden von der Testvorrichtung (Einbettform) erfüllt, die zusammen mit den Ingenieuren des Biomechaniklabors der Charité entwickelt wurde und bereits in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe Anwendung gefunden hatte (siehe Abb.16).

Auch beim Einbetten musste sorgfältig auf kontaktfreies Arbeiten der Einbettform mit dem Implantat geachtet werden. Nachdem der schnell aushärtende Kunststoff (Technovit 3040, Haraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland) angerührt und vorbereitet war, wurde er zum genau dosierten Einfüllen in die Testdose in eine Einmalspritze aufgezogen. Der Knochen mit dem Implantat wurde senkrecht zur Ebene der Grundplatte in Höhe der Öffnung

mit etwas Knochenwachs (Ethicon, Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, U.S.A) fixiert. Um einen Übertritt des anfangs noch flüssigen Kunststoffes in den distalen Markraum zu vermeiden, wurde der Knochen-Grundplatten-Spalt vollständig durch weiteres Anmodellieren von Knochenwachs abgedichtet. Zeitnah wurde nun der Raum zwischen Einbettform und Knochen mit Technovit-Kunststoff ausgefüllt, der sich in der Aushärtung befand. Bis zur vollständigen Aushärtung konnten noch geringe Lagekorrekturen zur lotrechten Positionierung und dem Anbringen der Deckplatte gemacht werden. Einige Minuten später war das Technovit ausgehärtet und Grund- und Deckplatte wurden entfernt. Die Deckplatte mit der größeren Öffnung wurde nun anstelle der Grundplatte eingesetzt. Dadurch wurde ein reibungsfreier Testablauf gewährleistet.

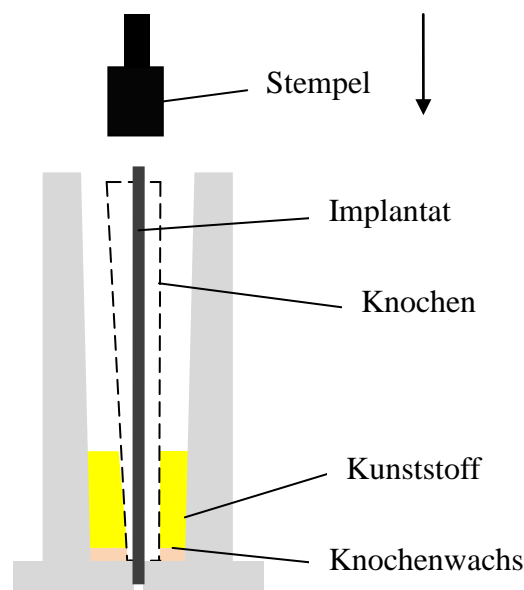


Abbildung 16: Testvorrichtung „push out“ Test (ohne Deckplatte)

#### 2.8.4 Der „Push-out“ Test

Für die biomechanische Testung wurde die Zwick<sup>®</sup> Materialprüfmaschine 1455 (Zwick, Ulm, Deutschland) wie folgt konfiguriert: Von zwei übereinander in der Maschine befestigten Traversen bewegte sich die obere auf die untere zu. Die Einbettform mit eingebettetem

Testobjekt wurde auf einem festen unteren Stahlzylinder mit zentralem Hohlraum auf der unteren Traverse platziert. An der oberen Traverse war zuerst eine Kraftmessdose befestigt, darunter ein zweiter Stahlzylinder mit zentralem, auf den unteren Zylinder zeigendem Stempel. Die Kraftmessdose maß die auf den Stempel wirkende Kraft, welche von einem angeschlossenen Computer aufgezeichnet wurde (siehe Abb.17).

Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde die Einbettform auf dem unteren Stahlzylinder so zentriert, dass die Achsenrichtung des Implantats mit der Arbeitsrichtung des Stempels übereinstimmte. Dann wurde das obere Implantatende dem Stempel angenähert. Nach dem Start der Messung bewegte sich die untere Traverse mit 2mm/min auf die obere zu. Dabei drückte der Stempel das Implantat aus dem in der Einbettform fixierten Knochen (siehe Abb.16 und 18). Die dabei benötigte Kraft wurde von der Kraftmessdose gemessen, die Messwerte als Rohdaten auf dem Computer gespeichert und auf einem angeschlossenen Bildschirm als Zeit/Kraft Diagramm graphisch dargestellt. Sobald das Implantat 4mm aus dem Knochen herausgedrückt war, wurde die Messung beendet.



Abbildung 17: Zwick® Materialprüfmaschine



Abbildung 18: Stempel und Einbettform



### 2.8.5 Auswertung

Zum einheitlichen Vergleich aller getesteten Implantate wurde individuell die beim „push-out“ Versuch benötigte Scherkraft mit der Einheit Megapascal ermittelt. Die Auswertung wurde modifiziert durchgeführt nach Schmidmaier et. al.<sup>187</sup>. Die konvertierten Rohdaten der Einzeltests, ausgelesen von der Zwick<sup>®</sup> Materialprüfmaschine, wurden dazu mit Hilfe von Excel (Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, U.S.A.) ausgewertet. Als entscheidender Wert wurde die Kraft angenommen, die zur initialen Lockerung des Implantats aus seiner ursprünglichen Position im Knochen benötigt wurde. Diese initiale „push out“ Kraft  $F_{IP}$  wurde von der Maschine in Newtonmeter [Nm] gemessen. Um die Scherkraft  $P$ [Mpa] für jeden Knochen einzeln zu bestimmen, wurde die  $F_{IP}$  durch die maximal mögliche Kontaktfläche  $A$ [mm<sup>2</sup>], zwischen Knochen und Implantat dividiert. Die mögliche Kontaktfläche wurde nach folgender Formel errechnet:

$$A[mm^2] = 2 \times \Pi \times r[mm] \times h[mm]$$

Wobei  $A$ [mm<sup>2</sup>] die maximale Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat als Mantelfläche eines gedachten Zylinders ist. Die Höhe ist gleich der mittels digitalen Messschiebers gemessenen Knochenlänge nach Knochenvorbereitung. Der Radius wurde durch die Stärke des Kirschner-Titannagels (2,5mm) bestimmt.

$$\frac{F_{IP}[Nm]}{A[mm^2]} = P[Mpa]$$

## 2.9 Histologische Untersuchung\*

Die Knochen wurden, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, entnommen. Eine Tibia wurde für die biomechanische Testung verwendet, die kontralaterale Tibia wurde für die histologische Untersuchung präpariert. Sofort nach Freipräparation des Knochens wurde dieser für drei Tage in 10% normalgepuffertem Formaldehyd fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Alkohol 70%, 80%, 96%, 100%; Herbeta Arzneimittel, D-Berlin), in Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) entfettet und anschließend in Technovit 7200 (Haraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., Deutschland) eingebettet. Es wurden dann Schliffpräparate mit liegendem Implantat und einer Stärke von ca. 90µm angefertigt. Der deutliche Vorteil dieser bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Technik gegenüber Koronarschnitten liegt in der durchgehenden Beurteilbarkeit der Knochen-Implantat Kontaktstrecke in einer vergleichbaren Ebene. Dann wurde der Knochenschliff nach v. Kossa/Safranin-O gefärbt und am Mikroskop (Leica DM-RB, D-Bensheim) mit 10facher Vergrößerung mittels Kreuztisch (Merzhäuser, Deutschland) automatisiert eingelesen. Nachfolgend wurden in der Auswertung die direkten Knochen-Implantat-Kontaktstrecken gemessen. Des Weiteren wurden die Bilder auf morphologische Auffälligkeiten, im Sinne von Entzündung, lokaler Nebenwirkung oder Fremdkörperreaktion nach Einbringung der Implantate, des Fibrinklebers oder der Fibrin-Plasmid Kombination untersucht und beurteilt.

\*Die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen sind Bestandteil einer weiteren Promotionsarbeit und wurden an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

## 2.10 Untersuchung der systemischen Transfektion\*\*

Da dem Sicherheitsaspekt bei diesem Versuchsvorhaben entscheidende Bedeutung zukommt, wurden zusätzlich zur Bestimmung der Blut- und Serumparmeter sowie des Körpergewichts neben dem Knochen auch andere Organe auf eine möglicherweise erfolgte Transfektion hin untersucht. Untersucht wurden im Einzelnen die Organe Gehirn, Hoden, Knochen, Leber, Lunge, Milz, Niere sowie Fettgewebe. Unerwünschte systemische Transfektionen sollten ausgeschlossen werden. Die RNA wurde getrennt aus den verschiedenen Geweben isoliert, in cDNA umgeschrieben, diese mittels reverser Transkriptase PCR amplifiziert. Via Gelelektrophorese wurden das Reporter-gen Luciferase, sowie das Housekeeping-Gen GAPDH nachgewiesen. Zur genaueren, insbesondere quantitativen Analyse wurde mit den Proben eine Real-Time-PCR durchgeführt. Durch diese Methoden wurden Rückschlüsse auf die Transfektionsrate gezogen ermöglicht.

\*\*Die Untersuchungen zur systemischen Transfektion sind Bestandteile einer weiteren Promotionsarbeit und wurden an dieser Stelle Verständnis- und Vollständigkeitshalber aufgeführt.

## 2.11 Statistik

Die erhobenen Variablen wurden in einer Fall-Variablen-Matrix mit Excel (Microsoft®, Redmond) dokumentiert und für die statistische Auswertung in SPSS (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.) importiert.

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Das 95% Konfidenzintervall drückte die statistischen Signifikanzen sowie die statistischen Unterschiede aus. Da es sich in den einzelnen Gruppen um nicht parametrisch verteilte, unabhängige Daten handelte, wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet, der als Gegenstück zum T-Test für parametrisch verteilte Stichproben häufig angewandt wird. Es wird mit dem U-Test die Nullhypothese bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  geprüft: Stammen zwei unabhängige Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit und sind ihre Summen bzw. die Funktionen der Verteilung gleich? Der Mehrgruppenvergleich geschah durch den Kruskal-Wallis Test (H-Test) und anschließender Bonferroni-Holm Adjustierung.

Die statistische Auswertung der erhobenen Blut- und Serumwerte, der messtechnisch ausgewerteten Röntgenaufnahmen sowie der Gewichtsdaten erfolgte mittels studentischen T-Tests.

Die Auswahl der Tests erfolgte nach Rücksprache mit Frau Olga Jakob aus dem Institut für Biometrie der Charité Berlin.

Graphisch wurden die Ergebnisse mittels Histogramm respektive Boxplot aufgearbeitet. Der Corpus des Boxplots wird vom 1. und 3. Quartil gebildet und vereint 50 Prozent der Werte in sich. Die Boxplotdarstellung enthält als Parameter den Median, das 25- und 75-Perzentil ( $Q_0$  und  $Q_u$ ), den Minimum- und den Maximumwert. Außerhalb dieser Graphik werden außerhalb oder weit außerhalb liegende Ausreißer abgebildet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Operation und makroskopische Befunde**

Mit einer Ausnahme wurde die Operation von den Tieren gut toleriert. Ein Tier verstarb einen Tag nach der Operation. Als Ursache wurde eine nicht gewichtsadaptierte Dosierung bzw. fehlende Toleranz der Injektions- und Inhalationsnarkotika vermutet. Ein weiteres Tier verstarb im Verlauf der postoperativen Beobachtungen. Die Tiere belasteten ihre operierten Hinterläufe innerhalb eines Tages nach abklingen des Wundschmerzes bereits voll. Bei einigen Tieren, die mit der BMP – 2 Plasmidformulierung behandelt wurden, zeigte sich in den ersten drei postoperativen Tagen eine Schwellung. Weder die mikrobiologischen Wundabstriche noch die Blutuntersuchungen konnten eine Infektion oder lokale Entzündungsreaktion nachweisen. Unter konservativer Therapie heilten diese komplikationslos aus.

### **3.2 Blutbild und -serum Untersuchungen**

Im entnommenen peripher-venösen Blut wurden in Untersuchung von Blutbild und –serum die folgenden Parameter bestimmt: Natrium, Kalium, Chlorid, CRP, Leukozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, MPV und RDW. Die Analysen des Blutes zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen während des gesamten Untersuchungszeitraumes (siehe Tab. 3). Des Weiteren konnte laborchemisch im Verlauf keine lokale oder systemische Infektion oder Reaktion nachgewiesen werden.

Tabelle 3: Blutwerte (Mittelwert und Standardabweichung)

	Tag 1 (OP)	Tag 28	Tag 1 (OP)	Tag 56
	Kontrolle (I a)		Kontrolle (I b)	
Natrium (mmol/l)	142,4 ± 2,6	145,4 ± 3,8	144,9 ± 4,55	148,38 ± 5,44
Kalium (mmol/l)	5,3 ± 2	4,3 ± 0,6	4,1 ± 1,88	5,22 ± 2,48
Chlorid (mmol/l)	100,1 ± 3,6	102,4 ± 1,6	100 ± 3,92	105 ± 4,99
CRP (mg/dl)	0	0	0,02 ± 0	0,02 ± 0
Leukozyten (/nl)	4,7 ± 1,7	4,8 ± 1,4	5,23 ± 2,11	6,11 ± 1,49
Erythrozyten (/pl)	6,2 ± 0,5	5,5 ± 0,5	6,17 ± 0,36	5,86 ± 0,44
Hämoglobin (g/dl)	12,8 ± 0,6	11,5 ± 0,8	13,1 ± 0,9	11,96 ± 0,47
Hämatokrit (l/l)	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,02
MCH (pg)	20,8 ± 0,9	21 ± 1,5	21,22 ± 0,82	20,4 ± 1,09
MCV (fl)	66,4 ± 4,3	68,4 ± 5,4	67,57 ± 1,71	66,14 ± 2,41
RDW (%)	14,1 ± 1,1	14,3 ± 1	15,55 ± 1,21	16,11 ± 0,89
Thrombozyten (/nl)	347,1 ± 126,8	364,7 ± 83,8	276 ± 114,24	504 ± 139,27
MPV (fl)	7,5 ± 0,9	8,5 ± 1,6	7 ± 0,81	6,2 ± 1,79
	Fibrin (II a)		Fibrin (II b)	
Natrium (mmol/l)	143,5 ± 2,9	145,38 ± 3,8	145,1 ± 3,68	143,38 ± 1,76
Kalium (mmol/l)	3,9 ± 0,4	4,7 ± 1,9	4,26 ± 0,74	4,17 ± 0,37
Chlorid (mmol/l)	96,9 ± 3,91	101,5 ± 4,44	101 ± 5,1	102,5 ± 3,63
CRP (mg/dl)	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0
Leukozyten (/nl)	5,5 ± 1,9	5,7 ± 1,2	3,97 ± 1,63	8,28 ± 3,31
Erythrozyten (/pl)	5,9 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,2 ± 0,46	5,66 ± 0,45
Hämoglobin (g/dl)	13,4 ± 1,7	12,3 ± 1,1	12,93 ± 1,12	12,19 ± 0,89
Hämatokrit (l/l)	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,41 ± 0,03	0,38 ± 0,03
MCH (pg)	22,5 ± 2,4	21,28 ± 0,7	20,84 ± 0,91	21,42 ± 0,95
MCV (fl)	68,1 ± 2,03	68,8 ± 2,31	66,57 ± 2,99	67,28 ± 2,87
RDW (%)	14,8 ± 1,1	15,7 ± 1,3	14,85 ± 1,39	14,78 ± 0,65
Thrombozyten (/nl)	423 ± 83,26	417 ± 122,62	335 ± 92,16	526 ± 250,56
MPV (fl)	6,5 ± 1,6	6,8 ± 1,6	6,85 ± 0,89	5,85 ± 0,69
	BMP (III a)		BMP (III b)	
Natrium (mmol/l)	142,4 ± 1,1	140,7 ± 2,06	142,9 ± 2,53	140,75 ± 8,48
Kalium (mmol/l)	4,99 ± 1,62	4,43 ± 0,85	4,21 ± 0,32	4,18 ± 0,89
Chlorid (mmol/l)	102 ± 1,97	98,33 ± 3,21	92,5 ± 0,71	111,3 ± 22,86
CRP (mg/dl)	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0
Leukozyten (/nl)	6,39 ± 3,65	5,02 ± 1,81	6,56 ± 1,26	7,25 ± 2,14
Erythrozyten (pl)	6,47 ± 0,53	6,19 ± 0,36	6,55 ± 0,44	6,39 ± 0,37
Hämoglobin (g/dl)	13,49 ± 0,88	13,61 ± 1,13	13,9 ± 0,57	13,16 ± 0,82
Hämatokrit (l/l)	0,41 ± 0,02	0,4 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,4 ± 0,01
MCH (pg)	20,88 ± 0,95	22 ± 1,18	21,27 ± 0,7	20,6 ± 0,42
MCV (fl)	64,42 ± 2,82	65 ± 2,76	64,75 ± 2,55	63,16 ± 2,78
RDW (%)	14,62 ± 1,66	15,03 ± 0,71	15,4 ± 1,61	15,26 ± 1,61
Thrombozyten (/nl)	381 ± 95,95	298 ± 139,17	311 ± 75,78	316 ± 183,6
MPV (fl)	5,71 ± 0,48	5,66 ± 0,51	5,75 ± 1,03	6,33 ± 1,36

### 3.3 Körpergewicht und Körpertemperatur

Es konnte in allen Gruppen im beobachteten Zeitraum eine geringe, aber nur in einer Gruppe signifikante, Gewichtszunahme verzeichnet werden. Die signifikante Gewichtszunahme ( $p = 0,03$ ) fand in der 56 Tage Gruppe mit Fibrinkleber ohne Plasmid statt (siehe Tab.4\*). Auch die Messungen der Körperkerntemperatur wiesen keine erheblichen Schwankungen als Zeichen einer beginnenden oder bestehenden systemischen Infektion auf, sie lag beständig ohne große Abweichung bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels studentischen T-Tests.

**Tabelle 4: Körpergewichte, Mittelwert und Standardabweichung (\* $p < 0,05$ , Studentischer T-Test).**

	Tag 1 (OP)	Tag 28	Tag 1 (OP)	Tag 56
	Kontrolle (I a)		Kontrolle (I b)	
Gewicht (kg)	$2,8 \pm 0,4$	$3 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,3$
	Fibrin (II a)		Fibrin (II b)	
Gewicht (kg)	$2,8 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$	<b><math>2,8 \pm 0,2^*</math></b>	<b><math>3,1 \pm 0,3^*</math></b>
	BMP (III a)		BMP (III b)	
Gewicht (kg)	$3,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$

### 3.4 Radiologische Untersuchung

Die radiologischen Verlaufsuntersuchungen zeigten bei allen Tieren postoperativ korrekt und vergleichbar platzierte Implantate. Es konnten keine Entzündungs- oder Lockerungszeichen wie z.B. Osteolysen oder Implantatdislokationen, festgestellt werden. Der radiologisch verfolgte Heilungsverlauf zeigte große Ähnlichkeit im Bezug auf das Einwachsen der Implantate. Makroskopisch gab es keinen Anhalt für übermäßigen Knochenzuwachs. Es wurde keine ektopische Knochenbildung in den radiographisch abgebildeten Körperabschnitten beobachtet (Beispielbilder siehe Abb. 15).

Bei fünf Tieren wurde eine hypertrophe Gewebsreaktion mit Kallusbildung bzw. Knochenmarksödem (Bone Bruise) beobachtet. Diese Knochen wurden daraufhin nicht biomechanisch, sondern histologisch ausgewertet. Dasselbe galt für zwei Knochen, die nach der Tötung eine Fraktur aufwiesen. Ob diese akzidentiell zugefügt wurde oder postoperativ auftrat, war im Nachhinein nicht eruierbar.

Das angefertigte Messprotokoll zeigte als generellen Trend eine Durchmesserzunahme der auf Grundlage der Röntgenbilder vermessenen Knochen. In der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Zunahme der Knochendurchmesser. Zwei der acht gemessenen signifikanten Zuwächse ließen sich in der Fibringruppe feststellen. Die restlichen sechs Signifikanzen ergab der Messwertvergleich aus den BMP-2 Gruppe.



**Tabelle 5: Von den Röntgenbildern erhobene Werte der maximalen proximalen und distalen Breite, sowie der minimalen diaphysären Breite von beiden Tibiae [mm], Mittelwerte und Standardabweichung (\*p=<0,05, Studentischer T-Test)**

	Tag 1 (OP)	Tag 28	Tag 1 (OP)	Tag 56
	Kontrolle (I a)		Kontrolle (I b)	
Rechte Tibia				
Proximal	18,4 ± 1	18,7 ± 0,9	18,2 ± 0,9	18,2 ± 1
Diaphysär	5,3 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,38	5,5 ± 0,3
Distal	8,3 ± 1	8,8 ± 0,9	9,3 ± 1,24	8,9 ± 1,1
Linke Tibia				
Proximal	18,4 ± 1	18,6 ± 0,9	18 ± 0,8	18,2 ± 0,8
Diaphysär	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,7 ± 0,6
Distal	9,3 ± 1,5	8,3 ± 0,9	9,2 ± 0,7	9,4 ± 1
	Fibrin (II a)		Fibrin (II b)	
Rechte Tibia				
Proximal	<b>18 ± 0,2*</b>	<b>18,4 ± 0,3*</b>	17,5 ± 1,1	17,8 ± 0,8
Diaphysär	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,1 ± 0,5	5,2 ± 0,5
Distal	9 ± 0,7	9,2 ± 0,5	8,4 ± 1,3	8,9 ± 0,5
Linke Tibia				
Proximal	18,2 ± 0,4	18,5 ± 0,4	17,5 ± 0,9	17,9 ± 0,9
Diaphysär	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,4	<b>5 ± 0,4*</b>	<b>5,7 ± 0,8*</b>
Distal	9,4 ± 0,5	9,1 ± 0,4	8,9 ± 0,6	9,8 ± 1,4
	BMP-2 (III a)		BMP-2 (III b)	
Rechte Tibia				
Proximal	<b>18,1 ± 0,5*</b>	<b>18,9 ± 0,6*</b>	<b>18,2 ± 0,6*</b>	<b>18,3 ± 0,4*</b>
Diaphysär	5,4 ± 0,8	6 ± 0,9	<b>5,2 ± 0,3*</b>	<b>5,9 ± 0,6*</b>
Distal	<b>8,9 ± 0,8*</b>	<b>10,5 ± 1,9*</b>	<b>8,5 ± 0,7*</b>	<b>9,9 ± 2,5*</b>
Linke Tibia				
Proximal	18,1 ± 0,8	18,4 ± 0,9	18,1 ± 0,5	18,9 ± 0,8
Diaphysär	5,3 ± 0,3	5,9 ± 0,8	<b>5,1 ± 0,2*</b>	<b>5,6 ± 0,4*</b>
Distal	8,5 ± 1,5	9,8 ± 1,9	8,1 ± 0,2	9,7 ± 1,2

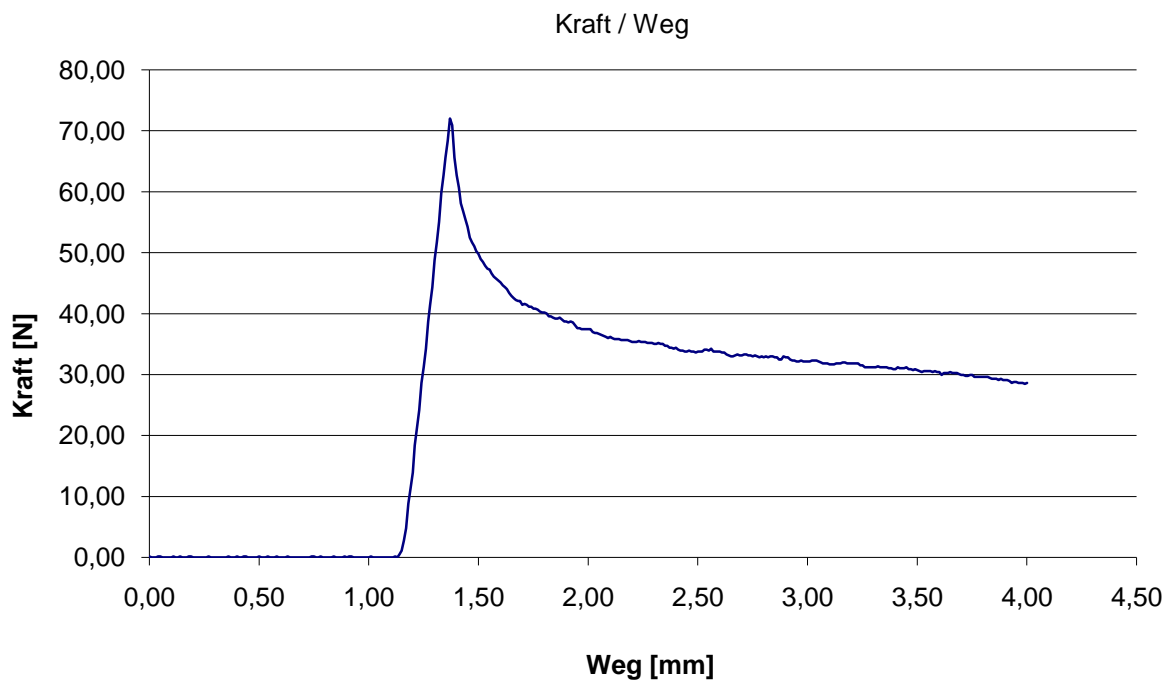
### 3.5 Biomechanische Testung

In die Studie wurden für die biomechanische Untersuchung 42 Tiere aufgenommen. Für die Kontrollgruppen standen aus der 28 Tage-Gruppe sieben (wie o.g. war postoperativ ein Tier verstorben), aus der 56 Tage-Gruppe acht Tiere zur Verfügung. Durch ein bei der Präparation der Knochen akzidentiell gelockertes Implantat wurden in der Fibrinversuchsgruppe von den Tieren mit 28 Tagen Standzeit drei, von den Tieren mit 56 Tagen Standzeit eins ausgeschlossen. Somit standen in diesen Untergruppen fünf, bzw. sieben Tiere zur Auswertung bereit. In der BMP-2 Versuchsgruppe starb ein Tier, wodurch nach 28 Tagen Standzeit in dieser Gruppe nur sieben Tiere zur Verfügung standen. Alle anderen Gruppen waren in Bezug auf die Größe bei Operation und Auswertung unverändert.

Wie oben beschrieben wurden die an der Materialprüfmaschine gewonnenen Werte (Initiale Push-out Kraft[N]) zur besseren Gegenüberstellung in die Scherkraft [MPa] auf die individuell verschiedene Knochenlänge umgerechnet.

Nach 28 und nach 56 Tagen zeigten die präparierten Knochen ein vergleichbares makroskopisches Bild. Es fanden sich, abgesehen von den oben genannten Frakturen, keine Auffälligkeiten wie beispielsweise Knochenmissbildung oder heterotope Ossifikation. Der Titannagel zeigte nach Präparation und vor der Testung einen festen Sitz. Die Testung aller Proben fand unter gleichen, standardisierten Bedingungen statt.

Optisch zeigte die Messkurve bei nahezu allen Testungen einen charakteristischen Verlauf: Eine schnell ansteigende Kurve mit spitzwinklig geformtem Maximum gefolgt von einem langsam aber stetig abflachenden Kurvenverlauf (siehe Abb. 20). Dieser Verlauf zeigt den initial stabilen und korrekten Sitz des Implantats, die Lockerung aus dem umgebenden Knochenbett (Maximalwert) und die weitere Bewegung des Nagels unter Aufwendung geringerer Kraft nach der Lockerung.

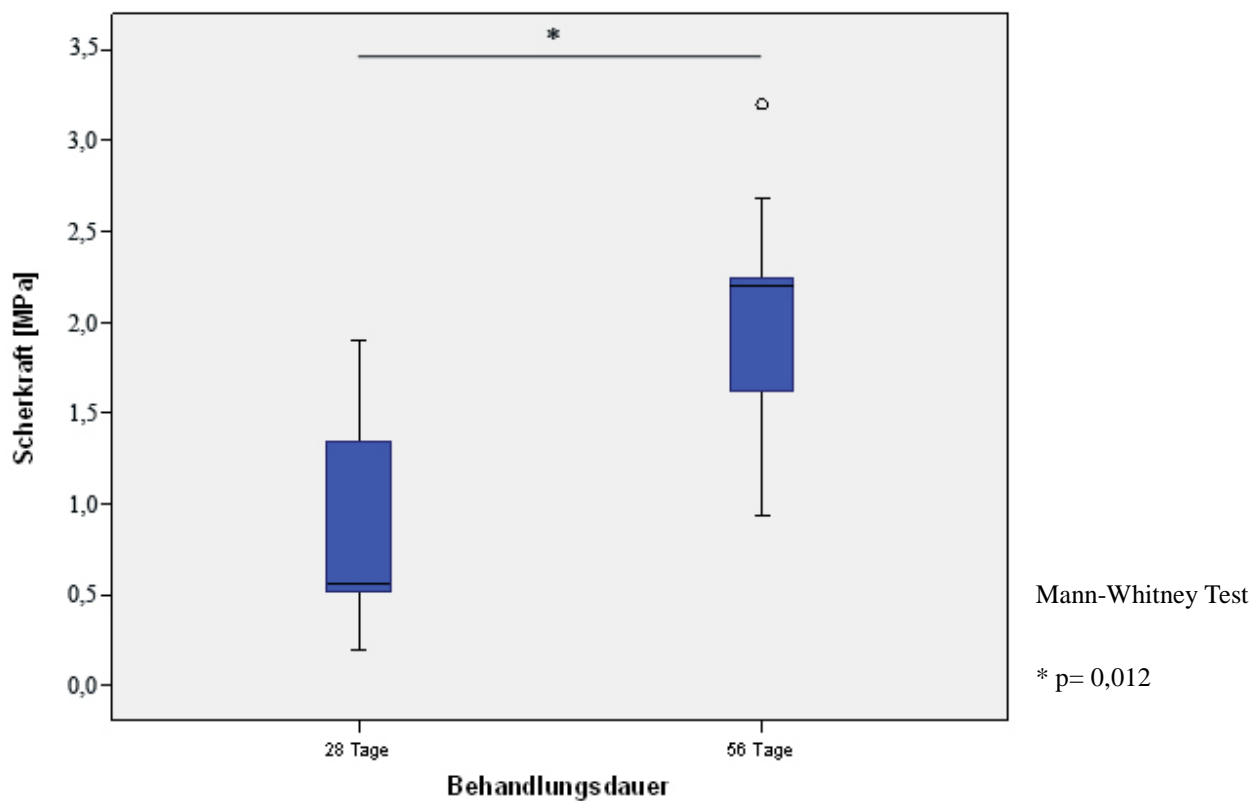


**Abbildung 19: Beispielmesskurve.** Die applizierte Kraft [N] auf der Ordinate ist über dem zurückgelegten Weg [mm] auf der Abszisse aufgetragen.

Es zeigten sich in der statistischen Testung signifikante Gruppenunterschiede sowohl zwischen den Standzeiten innerhalb der Subgruppen, als auch unter den Subgruppen innerhalb derselben Standzeit. Die Signifikanzen errechnen sich aus der gruppeninterindividuellen Gegenüberstellung mit dem Mann-Whitney Test.

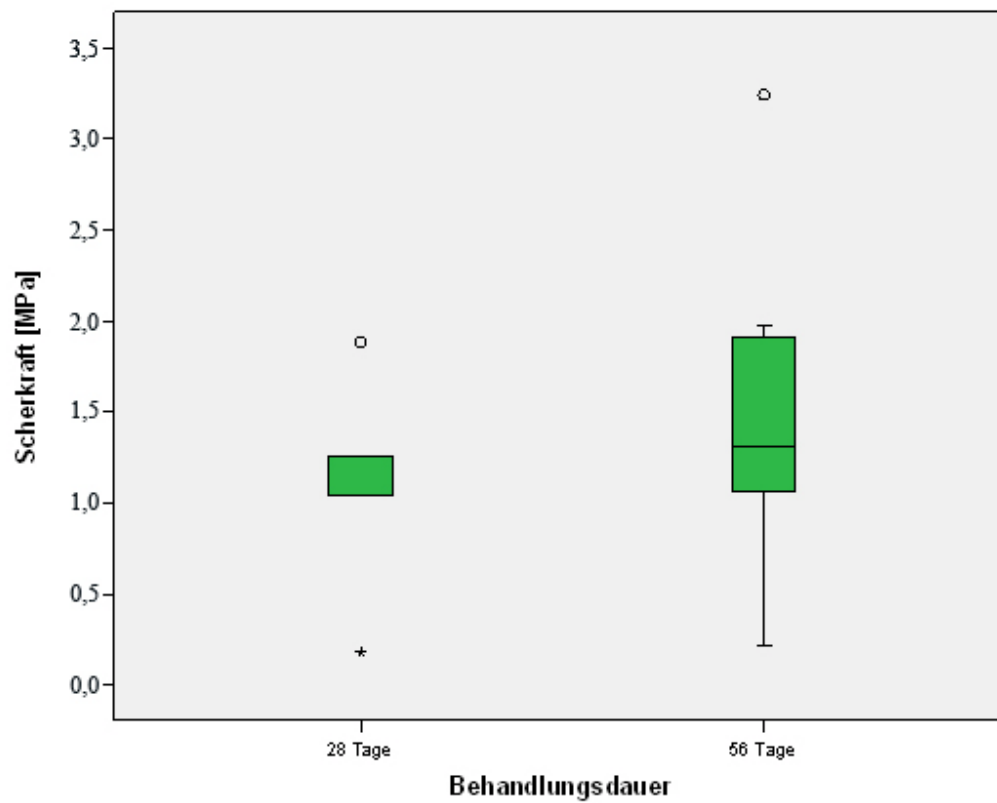
Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse nach Standzeit aufgeschlüsselt.

In der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich eine Zunahme der ermittelten mittleren Scherkraft von 0,91 MPa (SD 0,66) nach 28 Tagen auf 2,05 MPa (SD 0,67) nach 56 Tagen ( $p=0,012$ ) (siehe Abb.20).



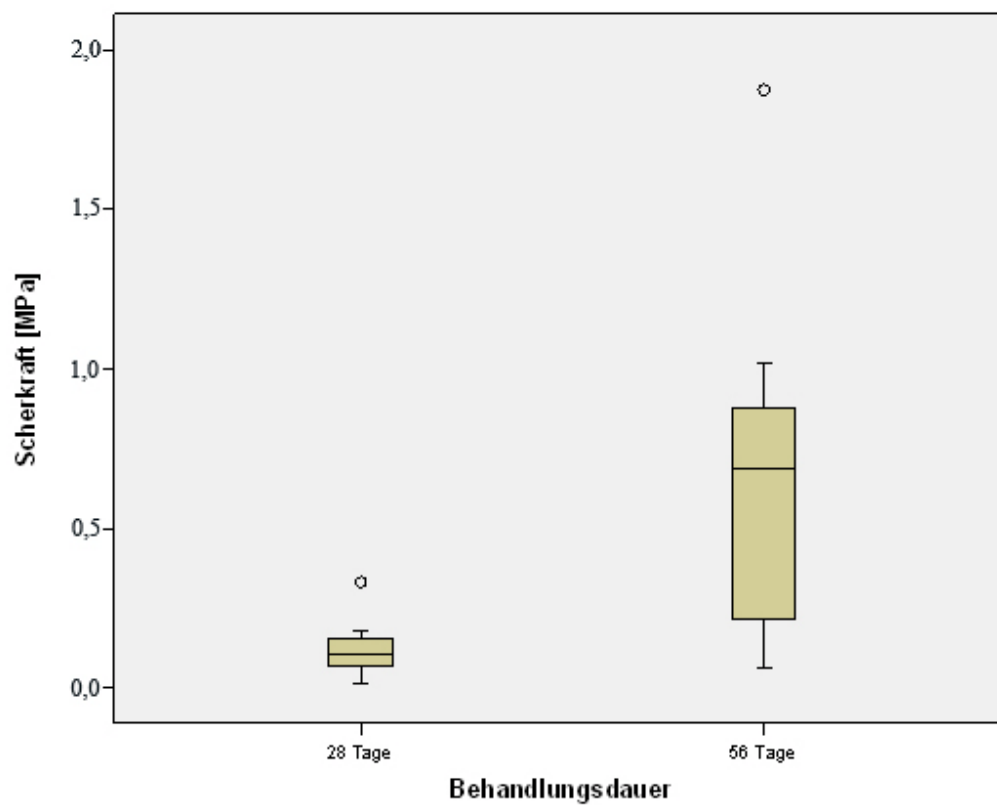
**Abbildung 20: Kontrollgruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Nach 56 Tagen zeigte sich eine signifikant höhere Scherkraft.**

In der Fibringruppe zeigt sich beim Vergleich von 28 Tage und 56 Tagen kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 21).



**Abbildung 21: Fibringruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Scherkraft.**

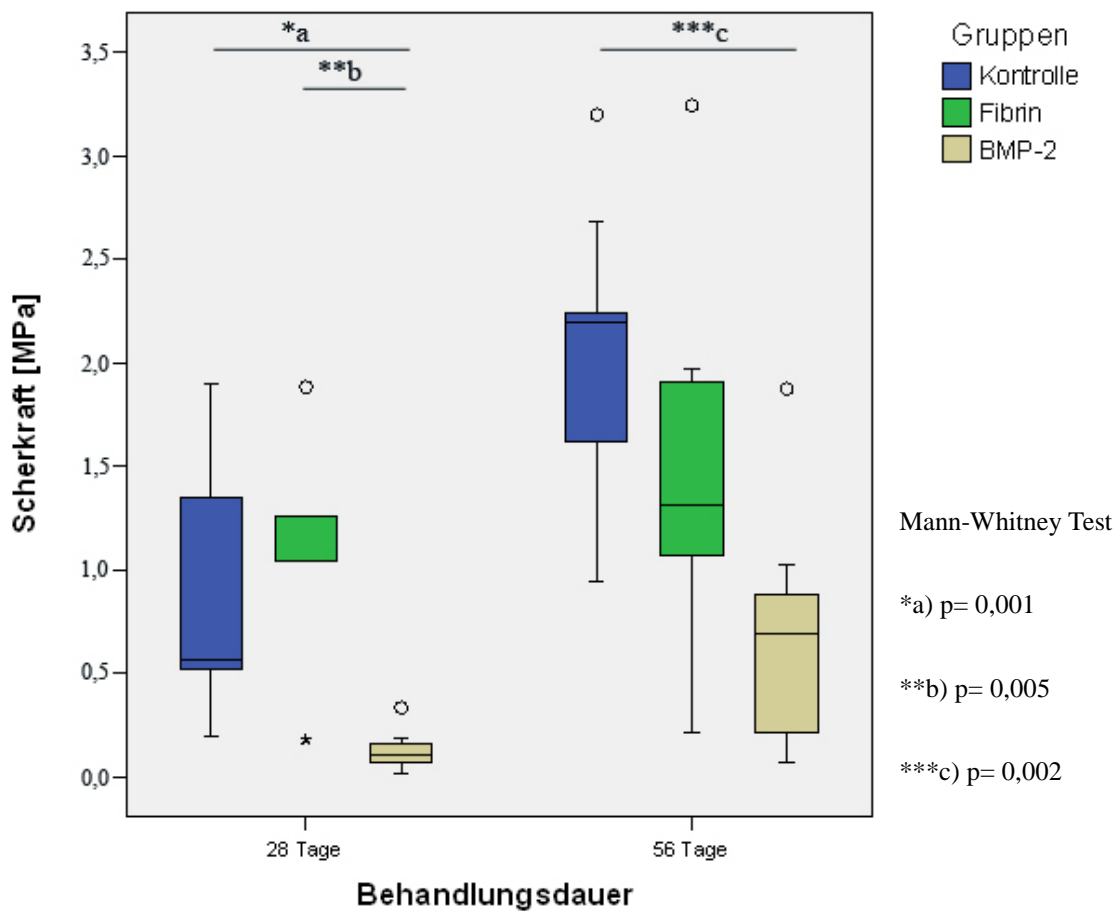
Es konnte bei der biomechanischen Testung der BMP-2 Gruppe ein nichtsignifikanter Anstieg ( $p=0,04$ ) der benötigten Scherkraft von 0,13 MPa (SD 0,10) nach 28 Tagen auf 0,69 MPa (SD 0,58) nach 56 Tagen verzeichnet werden (siehe Abb. 22).



**Abbildung 22: BMP-2 Gruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Scherkraft.**

Zwischen den Einheilungsfestigkeiten der Implantate der Kontrollgruppe und der Fibringruppe nach 28 Tagen ergab sich bei mittleren Scherkräften von 0,91 MPa (SD 0,66) bzw. von 1,08 MPa (SD 0,61) kein signifikanter Unterschied. Jedoch zeigten beide Gruppen höhere initiale Implantatfestigkeiten als die BMP Gruppe mit 0,13 MPa (SD 0,1), (Kontrollgruppe  $p=0,001$ , Fibringruppe  $p=0,005$ ). Nach einer Behandlungsdauer von 56 Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der berechneten Scherkraft zwischen der Kontrollgruppe mit 2,05 MPa (SD 0,67) und der Fibringruppe mit 1,34 MPa (SD 1,04). Der Mittelwert der berechneten Scherkraft in der Gruppe mit BMP-2 Plasmidformulierung lag bei 0,69 MPa (SD 0,58). Wie bereits im Vergleich nach 28 Tagen festgestellt werden konnte, war auch nach 56 Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der BMP-2 Gruppe ( $p=0,002$ ) zu finden. Zwischen der BMP und der Fibringruppe war kein signifikanter Unterschied ( $p=0,054$ ) (siehe Abb. 23).

Im Folgenden sind die mittels Boxplot zusammengefassten Ergebnisse verteilt auf die zwei Behandlungszeiträume und die drei Behandlungen dargestellt.



**Abbildung 23: Gruppenübersicht: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen in allen Gruppen. Höchste Scherkraft in der Kontrollgruppe nach 56 Tagen, die BMP-2 und die Fibringruppe zeigten signifikant weniger Scherkraft.**



### **3.6 Histologische Untersuchung\***

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung liegen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor.

### **3.7 Untersuchung der systemischen Transfektion\***

Der lokale Transfektionsnachweis mittels Reporter-gen mRNA war in 22 von 24 entnommenen Knochen zu verschiedenen Zeitpunkten positiv. Damit muss in allen Bereichen der untersuchten Tibiae von einer Transfektion ausgegangen werden. In 15 von 72 entnommenen Organproben war der Luciferasenachweis positiv. Präferentiell waren Lunge und Hoden betroffen, Muskelgewebe seltener. Eine Korrelation mit bestimmten Standzeiten der Tiere konnte nicht gefunden werden. Somit kam es bei Applikation zu einer systemischen Transfektion.

\*Wie bereits erwähnt sind die histologische Untersuchung sowie die Untersuchungen zur systemischen Transfektion Bestandteile von weiteren Promotionsarbeiten und wurden an dieser Stelle Verständnis- und Vollständigkeitshalber aufgeführt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Wachstumsfaktoren werden bereits mit großem Erfolg in der Klinik angewendet. Problematisch sind die hohen Kosten, die geringe Bioverfügbarkeit *in-vivo* und die hohen Dosen, die notwendig sind, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Notwendig sind eine lokale Applikation und eine kontrollierte und nachhaltige Abgabe der Wachstumsfaktoren von einem Trägermaterial ohne dabei unerwünschte systemische Effekte hervorzurufen. Da der genetische Code der meisten Wachstumsfaktoren bekannt ist, kann mit der lokalen Applikation der Plasmide im Zielgewebe eine Expression des gewünschten Proteins durch einen gentherapeutischen Ansatz erreicht werden. Attraktiv auch im Hinblick auf die genannten Probleme wäre eine klinisch einfach anzuwendende, einmalige Applikation des Plasmids mittels Trägermaterial. Das Wachstumsfaktorgen ist hierbei im nichtviralen Vektor immobilisiert und in die Matrix des Trägermaterials eingebunden. Die Zellen wachsen ein, werden transfiziert, exprimieren den Wachstumsfaktor und stimulieren autokrin oder parakrin Zelldifferenzierung und -wachstum.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Versuch zum nichtviralen Gentransfer des BMP-2 Plasmids mittels des neuentwickelten nicht-viralen Genvektors COPROG auf der Basis von Fibrinkleber als Trägersubstanz durchgeführt. Im Tierversuch wurden 60 New Zealand White Rabbits operativ mit einem Titanimplantat in beide Tibiae versehen. Die Gruppenunterteilung geschah durch die postoperative Standzeit von 28 bzw. 56 Tagen. Weiter unterteilt wurde in je drei Untergruppen. Eine Kontrollgruppe, die nur das Implantat erhielt, eine Versuchsgruppe, die zusätzlich die Trägersubstanz Fibrinkleber erhielt und eine Versuchsgruppe, bei der ein BMP-2 kodierendes Plasmid in einem nicht-viralen neu entwickelten Vektor in einer Fibrinklebersuspension appliziert wurde. Die biomechanische Festigkeit der Implantateinheilung wurde anschließend im Auspressversuch (Push-out Test) gemessen. Der Knochen-Implantat Kontakt wurde histomorphometrisch vermessen\*. In einer weiteren Untersuchung wurden die Tiere auf eine systemische Transfektion hin untersucht.\* (\*Diese Untersuchungen sind nicht Gegenstand dieser Arbeit und die Ergebnisse wurden nur zusammenfassend aufgeführt.)

#### 4.1.1 BMP-2 Gruppe

Nach 28 tägiger Einheilungsdauer war die initial aufzuwendende Kraft beim Auspressversuch in der Kontroll- und Fibringruppe um den Faktor 7 bzw. 8,3 höher als in der BMP-2 Gruppe. Nach 56 Tagen verringert sich dieser Faktor in der gleichen Gegenüberstellung auf 2,9 bzw. 1,9. Wenn man die Kraft, die initial nötig war, um das Implantat aus seiner knöchernen Verankerung zu lösen, als Surrogatparameter für die biomechanische Festigkeit nimmt, zeigte sich keine Besserung durch die Applikation von BMP-2 Plasmiden. Im Gegenteil, es zeigte sich eher ein negativer Effekt auf die Implantateinheilung. Die Hypothese dieser Arbeit konnte somit nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind verglichen mit der Literatur widersprüchlich. BMP-2 wird überwiegend osteogenes Potenzial zugeschrieben. Die histologischen Untersuchungen werden weitere Hinweise für eine abschließende Betrachtung liefern, die Untersuchungen dauerten aber bei Anfertigung der vorliegenden Arbeit noch an. Die radiologischen Kontrollen zeigen einen unkomplizierten Verlauf der Implantateinheilung. Bei der Auswertung des erstellten Messprotokolls gibt es Hinweise auf ein erhöhtes Knochenwachstum in der BMP-2 Gruppe. Die biomechanischen Resultate dieser Arbeit zeigen, dass das Implantat in der BMP-2-Versuchsgruppe verglichen mit der Fibrin-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe deutlich schlechter inkorporiert wurde. Kommt es also zur Inhibition des Knochenwachstums? Diese Erkenntnis würde das bisherige Verständnis der biologischen Wirkung von BMP-2 kontrastieren. Eine kritische Betrachtung des Versuchsdesigns ist notwendig, und könnte eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse bieten und wird im Anschluss durchgeführt.

Zur Vergleichbarkeit des vorliegenden Versuchs mit anderen Arbeiten muss einschränkend festgestellt werden, dass in der Literatur vorwiegend virale Genvektoren zur Anwendung kommen, die zur *in-vivo*<sup>188</sup> oder *ex-vivo*<sup>189</sup> Therapie genutzt wurden. Erschwerend für die Vergleichbarkeit mit der Literatur kommt weiter hinzu, dass es mittlerweile mehr als 3000 BMP-Veröffentlichungen gibt, die Mitglieder der BMP-Familie auf potenzielle klinische Anwendbarkeit hin untersuchen vor dem Hintergrund ihres bekannten, den Knochenaufbau stimulierenden Effekts in Tier- und Zellkulturversuchen<sup>190</sup>. Der Fokus liegt dabei besonders auf BMP-2, -4 und -7. Die Ergebnisse dieser Studien sind allerdings widersprüchlich und Unterschiede im Versuchsdesign, wie z. B. verschiedene Therapieschemata, Dosierung und Trägermaterialien, erschweren einen direkten Vergleich.

Ähnliche Ergebnisse wie im vorliegenden Versuch wurden bereits auch im Kaninchenmodell anderer Arbeitsgruppen gewonnen. In einer Arbeit von Jeppsson et al. wurde ein inhibitorisches Potential von BMP-2 entdeckt<sup>191</sup>. Eine von der Gruppe entwickelte, teilweise durchlässige, Titankammer wurde in Kaninchentibiae geschraubt. In die Kammer wurde versuchsweise rekombinantes BMP-2 auf kollagenem Trägermaterial appliziert. Als Kontrolle diente die alleinige Applikation von Kollagen. Die anschließende Auswertung geschah durch Quantifizierung des in der Kammer neugewachsenen Knochens. Dabei zeigte sich die Wachstumsinhibition proportional zur BMP-2-Dosis. Die Ergebnisse reproduzierten sich auch in weiteren Versuchen mit veränderten Parametern. So konnte dieser Effekt auch mit verschiedenen Trägermaterialien und unabhängig von der Dosis gezeigt werden<sup>192</sup>. Der Versuchsaufbau dieser Arbeiten unterscheidet sich allerdings vom gegenwärtigen, insbesondere da BMP-2 als rekombinantes Protein verabreicht wurde.

Zum Zeitpunkt dieses Versuchs fanden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten, die einen positiven Effekt von BMP-2 auf die Implantateinheilung beschrieben. Lutz et al. konnten eine gute Osseointegration von Implantaten durch die Verabreichung von BMP-2 Plasmid mit Kollagen als Trägermaterial in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit dem Trägermaterial versehen wurde, erreichen<sup>193</sup>. Die Implantate wurden allerdings anders als im gegenwärtigen Versuch nur mikroradiographisch und histologisch, nicht biomechanisch untersucht. Auch wurde ein liposomaler nicht-viraler Vektor benutzt. Dennoch unterstützen diese Ergebnisse die These, dass eine gute Implantatinkorporation mittels nicht-viralem BMP-2 Gentransfer mit positiven Ergebnissen durchführbar ist.

In einer neueren Arbeit von Baas et al. zeigte rekombinantes BMP-2 einen negativen Effekt auf die Implantatinkorporation im Tierversuch mit Schraubenimplantat und Allograft<sup>194</sup>. Die Versuchsdauer von 28 Tage ist analog zu einem Untersuchungszeitpunkt im gegenwärtigen Versuch. Die biomechanischen Untersuchungen zeigten bei Baas, dass bei dem mit BMP-2 stimulierten Knochen nur etwa die Hälfte der Scherkraft im push-out Test - verglichen mit der Kontrollgruppe - zur Implantatentfernung benötigt wurde. Das entspricht ungefähr den Ergebnissen nach 56 Tagen. Bei Baas zeigte die BMP-2 Gruppe histologisch eine vermehrte Knochenbildung. Die Knochenbildung trat allerdings nur anstelle des abgebauten Allografts und auf und konnte daher keine mechanische Stabilität gewährleisten. Möglicherweise wird also durch BMP-2 nicht nur das Knochenwachstum beschleunigt, sondern auch die

Knochenresorption, indem BMP-2 vorübergehend die Osteoklastenaktivität stärker stimuliert. Aus Zellversuchen ist die gemeinsame Stimulation von Osteoblasten und Osteoklasten bekannt<sup>67, 195</sup>. Toth et al. konnten die Osteoklasteninduktion in einer tierexperimentellen Studie am Schaf mit rekombinatem BMP-2 zeigen<sup>196</sup>. Konzentrationsabhängig war die Knochenresorption, die durch radiographische und histologische Kontrolle festgestellt wurde, im Peri-Implantatgewebe erhöht. Diese *in-vivo* Ergebnisse bestätigen die von Wildemann et al. bei *in-vitro* Versuchen, wo ein dosisabhängiger Effekt von BMP-2 auf die Osteoklastenaktivität und Knochenresorption beobachtet wurde<sup>197</sup>. Dennoch resultierte nach 8 wöchiger Einheilung, im Kontrast zu diesem Versuch eine suffiziente Implantatinkorporation.

Bei genaueren Analysen der zellulären Lokalisation von Wachstumsinduktoren und –inhibitoren bei physiologisch heilenden menschlichen Frakturen konnte in einer Arbeit von Kwong et al. gezeigt werden, dass BMP-2 am stärksten im Bereich der Knorpelbildung und weniger bei der Knochenformation exprimiert wird<sup>198</sup>. In der Konsequenz könnte das bedeuten, dass die volle biologische Wirkung von BMP-2 eventuell besser in der Frakturheilung als in der Implantateinheilung erreicht und dort therapeutisch eingesetzt werden kann. Im vorliegenden Versuch geschah das Knochenwachstum direkt um das Implantat, anders als bei den häufig in der Forschung verwendeten Frakturmodellen, wo Knochenbildung über die Zwischenstufe der Knorpelbildung geschieht.

Die BMP-2 induzierte Apoptose in der Embryonalentwicklung ist seit längerem bekannt<sup>199</sup>. Die Literatur über das Potenzial von BMP-2 bei Osteoblasten Apoptose zu induzieren und die Proliferation von Osteoblasten zu inhibieren ist allerdings widersprüchlich. Gautschi et al. entdeckten in neueren Versuchen bei *in-vitro* Versuchen mit immortalisierten humanen fetalen Osteoblasten, dass die Applikation von rekombinatem BMP-2 dosisabhängig die Zellproliferationsrate senkt und temporär die Apoptoserate erhöht. Nach Kim et al. reagieren in *in-vitro* Versuchen humane mesenchymale Stammzellen auf die Stimulation mit rekombinatem BMP-2 nur im frühen Stadium der Differenzierung zu Osteoblasten mit einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase Expression<sup>200</sup>. Bei späteren Entwicklungsstufen war die Mineralisierungsaktivität durch Stimulation mit BMP-2 nicht signifikant erhöht.

Wenn die Erkenntnisse über das osteogene und das inhibitorische Potenzial von BMP-2 kombiniert werden, kann hypothesiert werden, dass eine zur Knochenheilung applizierte

Dosis von BMP-2 in Osteoblasten Apoptose induziert, undifferenzierte Stammzellen rekrutiert und ihre Differenzierung in Osteoblasten induziert. Induzierte Apoptose dient der physiologischen Balance zwischen Stimulation von Knochenbildung und der Unterdrückung von ungewünschtem Wachstum, wobei BMP-2 in diesem Regelkreis eine bedeutende Rolle zukommt.

Wie von Kwong et al. berichtet wird, könnte auch die Hemmung der BMP-2 Inhibitoren ein Weg sein, die Osteogenese zu beschleunigen<sup>201</sup>. Dabei sind Noggin<sup>202</sup> und Chordin<sup>201</sup> die natürlichen Antagonisten von BMPs über negative Feedback Mechanismen<sup>62</sup>. Um der Komplexität und der Vielzahl der BMPs und anderer Wachstumsfaktorsynergien gerecht zu werden, ist die Applikation eines Wachstumsfaktors oder eines für einen Wachstumsfaktor kodierendes Plasmid eventuell nicht ausreichend.

#### **4.1.2 Fibrin- und Kontrollgruppe**

Zwischen den Tieren der Kontroll- und Fibrinversuchsgruppe bestand weder nach 28 noch nach 56 Tagen ein signifikanter Unterschied in der Einheilungsfestigkeit, ermittelt durch die Scherkraft. Gegenteilig zur Hypothese des Versuchsvorhabens wurde mit der BMP-2 Applikation mittels dem Trägermaterial Fibrinkleber keine höhere biomechanische Festigkeit erreicht. Wahrscheinlich hängt dies jedoch nicht vom Fibrinkleber ab, da die alleinige Fibrinkleberapplikation keinen signifikanten Unterschied nach beiden Untersuchungszeiträumen zur Kontrollgruppe zur Folge hatte.

Experimentell werden viele Trägermaterialien erforscht. Die Matrix soll dabei als Trägermaterial für die kontrollierte Abgabe von Wirksubstanzen dienen und gleichzeitig als Zellgerüst die Zellmigration in der Gewebsregeneration steuern. Die Wiederherstellung der Vaskularisierung von Knochen sollte durch das Trägermaterial gefördert werden. Diese Prozesse sind jedoch in der Versuchspraxis meist nicht gut synchronisiert und die Abgabekinetik der Trägermaterialien erfolgt, bedingt durch die langsam hydrolysierte und resorbierte Matrix sowie die chemischen und physischen Löslichkeitseigenschaften der Proteine passiv<sup>203</sup>. Biologisch natürlicherweise vorhandene Materialien haben als Trägermaterialien Vorteile gegenüber synthetischen, da sie deutlich gewebeverträglicher sind.

Fibrin ist beteiligt an der Thrombenbildung, einem wichtigen Schritt der Hämostase. Die Hauptaufgabe des Fibrins, das auch bei der physiologischen Gewebereparatur vorkommt, ist es, eine provisorische extrazelluläre Matrix zu induzieren, die es Zellen ermöglicht, in sie einzuwachsen, sich zu differenzieren und das Fibrin schließlich zu ersetzen. Das Fibringerüst ist im Allgemeinen nach vier Wochen im Gewebe resorbiert<sup>204</sup>. Fibrin stellt die Eigenschaften der extrazellulären Matrix wieder her und erlaubt die Zellmigration, die von einer zellassozierten proteolytischen Aktivität abhängig ist<sup>205</sup>. Auch konnte es im Tierversuch von Kim et al. als Gerüst für autologe Osteoblasten zur Defektüberbrückung dienen<sup>206</sup>. Allerdings fehlt Fibrin die mechanische Stabilität zur Überbrückung eines Defekts<sup>207</sup>.

Eine Formulierungsmöglichkeit von Fibrin ist die Zubereitung eines Klebers. Klinisch wird dieser bereits seit mehr als 30 Jahren angewendet. Im vorliegenden Versuchsvorhaben zeigte Fibrinkleber keine limitierenden Eigenschaften bei der Implantateinheilung. Dennoch ist die Literatur widersprüchlich bei der Bewertung einer möglichen osteoinduktiven Eigenschaft von Fibrinkleber. Während Abiraman und Arbes et al. positiven Einfluss von Fibrinkleber auf die Knochenbildung berichteten<sup>161, 162</sup>, schilderten Jarzem et al.<sup>208</sup>, Pinholt et al.<sup>209</sup>, Turgut et al.<sup>210</sup> und Albrektsson et al.<sup>211</sup> einen inhibierenden oder zumindest retardierenden Effekt.

Wie einleitend erwähnt, gibt es eine Vielzahl von Ansätzen, die BMP-2-Applikation mit Fibrinkleber zu kombinieren. Die Anwendung von Fibrin als *in-vitro* Träger für die Zellaussaat wurde bereits von Mol et al. gezeigt<sup>212</sup>. Die Kombination von Fibrin mit Wachstumsfaktoren sowie die Anwendung als stabile Implantatumgebung ist bekannt<sup>213</sup>. Fibrin als Trägermaterial<sup>163</sup> oder Transfektionsmedium<sup>164</sup>, insbesondere für rekombinante BMP Proteine wie z.B. BMP-2<sup>150</sup> wurde bereits in vielen Tierversuchen angewendet. Erste Versuche dazu von Kawamura et al. zeigten Fibrin in Kombination mit rekombinantem BMP-2 der alleinigen BMP- Applikation überlegen<sup>214</sup>.

Der Fibrinkleber im vorliegenden Versuch zeigte, dass die Osteogenese durch das osteokonduktive Gerüst auch ohne viral transduzierte Zellen möglich ist und bestätigte die in der Literatur beschriebenen positiven Einflüsse von Fibrin auf die Knochenheilung. Dass Fibrin die natürliche Implantateinheilung nicht beeinträchtigt, konnte durch die biomechanischen Ergebnisse und das Ausbleiben einer systemischen Reaktion gezeigt werden.

### 4.1.3 Sicherheitsuntersuchung, Blutwerte und Gewicht

In der Sicherheitsuntersuchung zeigte sich, dass eine systemische Transfektion stattgefunden hat (Die Daten in dieser Arbeit zusammenfassend gezeigt). In 15 von 72 Organpräparaten gelang der Reporter-Gen-Nachweis. Durch den erhöhten intramedullären Druck bei der Applikation des Titannagels in den Markkanal wurde der Fibrinkleber möglicherweise zusammen mit dem Reporter-Gen herausgepresst und konnte sich so durch das Eindringen in lokale Blutgefäße systemisch verteilen. Im Verlauf des vorgenommenen Versuchs zeigte keines der Tiere makroskopische oder anhand von den bestimmten Serumparametern ableitbare Entzündungszeichen. Auch das Gewicht verhielt sich bei fast allen Gruppen im Verlauf unauffällig. Mit der signifikanten Gewichtszunahme in einer Gruppe ist höchstwahrscheinlich das dem jungen Alter entsprechende Größenwachstum erfasst.

### 4.1.4 COPROG, Transfektion und Expression

In wenigen Versuchen in der experimentellen Orthopädie kommen bisher nicht-virale Vektoren zur BMP-2-Applikation zum Einsatz. Gemeinsam ist diesen Versuchen bisher eine geringe Transfektionseffizienz<sup>105</sup>. Der in diesem Versuchsvorhaben angewandte nicht-virale Vektor<sup>138</sup> ist eine Neuentwicklung auf der Grundlage bereits vorher erfolgreich angewandter Polyethylenimin (PEI) Verbindungen<sup>143</sup>. Sowohl bei der *in-vitro* als auch bei der *in-vivo* Testung wurden hohe Expressionsraten mit dem PROCOP erreicht<sup>146</sup>. Die einzigen Versuche, bei denen Fibrinkleber wie im vorliegenden Versuch mit dem COPROG-BMP-2 Vektor verwendet wurden, stammen von Schillinger et al.<sup>139, 167</sup>. In neueren Versuchen wurde von dieser Arbeitsgruppe die Freisetzungskinetik und Transfektionseffizienz untersucht<sup>139</sup>. Immobilisiert in einer Fibrinklebermatrix wurde nackte Plasmid-DNA, verglichen mit dem COPROG-BMP-2 Plasmid, deutlich schneller freigesetzt (mehr als 80% gegenüber weniger als 10% in den ersten 20 Tagen). Die Freisetzungskinetik, die mittels COPROG erreicht wurde, war annähernd linear. Das könnte auch im vorliegenden Versuch von Bedeutung sein. So könnten die BMP-2 Plasmide zu langsam an die Zellen abgegeben worden sein, um den gewünschten schnellen Effekt zu haben. Weitere Relevanz hat möglicherweise die Beobachtung von Schillinger et al., dass COPROGs die Zeit, bis sich der definitive



Fibrinthrombus geformt hat, verlängert. Auch wenn ein fester Thrombus das Resultat ist, könnte diese Beobachtung ein Grund für die systemische Verteilung des Reportergens im vorliegenden Versuch sein. Vorversuche, die eine gute Anwendbarkeit von Plasmid-DNA in einer Matrix zeigten, stammen von Shea et al.<sup>215</sup>. Sie konnten *in-vivo* und *in-vitro* zeigen, dass eine mit Plasmid-DNA beladene Matrix aus dem Bereich des *Tissue Engineering* (PLG), in andauernder und suffizienter Zelltransfektion und Zunahme extrazellulärer Matrix resultierte. Diese Methode war der direkten Injektion von Plasmid DNA überlegen. Andree et al.<sup>164</sup> zeigten, dass Fibrinkleber gut mit nicht-viralen Genvektoren kombiniert werden kann, indem sie Keratinozyten auf eine Fibrinmatrix gaben, die mit für Wachstumsfaktor kodierenden Plasmiden beimpft war. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe ohne Plasmid wurde in der Versuchsgruppe Wachstumsfaktor sowohl *in-vitro*, als auch nach Implantation in einen Hautdefekt bei Mäusen *in-vivo* exprimiert. Analog dazu konnte von Schillinger et al. in Transfektionsversuchen mit Keratinozyten und Chondrozyten durch elektronenmikroskopische Detailaufnahmen eine rege endozytotische Aufnahme der nicht-viralen Vektoren durch die Zellen gezeigt werden. Auch wenn dies im gegenwärtigen Versuch nicht untersucht wurde, lässt diese Beobachtung auf eine erfolgreiche Transfektion der Zielzellen schliessen. *In-situ* durchgeführte BMP-2 Gentransfektion von Chondrozyten mittels COPROG führte bei Schillinger et al. zu erhöhter BMP-2 - und alkalischer Phosphatase-Expression unter Zunahme der extrazellulären Matrix. Dabei lag die von den Autoren berichtete BMP-2 Expression allerdings um den Faktor 500 niedriger als die BMP-2 Expression, die andere Gruppen mittels retroviralen<sup>216</sup> oder adenoviralen<sup>217</sup> Vektoren erreichten. Zudem war die erhaltene Konzentration 3-10fach niedriger als die minimale Konzentration, die für die Stimulation von Rattenperichondriumzellen beschrieben wurde<sup>166</sup>. Am ehesten konvergent mit der vorliegenden Arbeit, wenn auch unterschiedlich im Versuchsdesign, ist die Beobachtung aus einem weiteren *in-vivo* Versuch der Arbeitsgruppe Schillinger et al.. Hier wurden autolog aus einer Kaninchentibia entnommene Chondrozyten *in-vitro* zusammen mit dem COPROG-BMP-2 Genvektor in Fibrinkleber immobilisiert und anschließend *in-vivo* in den osteochondralen Defekt reimplantiert. Es konnte keine Steigerung des Knorpelwachstums im Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachtet werden, obwohl das chondrogene Potential von BMP-2 ebenso bekannt ist wie das osteogene<sup>216</sup>. Fraglich ist allerdings, ob die fehlende Induktion auf den oben vermuteten inhibitorischen Effekt zurückzuführen ist, insbesondere, da eine andere Zelllinie betroffen ist. Diese Methode hätte auch für einen eventuellen

klinischen Einsatz den Nachteil, dass Zellen entnommen und kultiviert werden müssen, was aufwendig und teuer ist<sup>189</sup>. In einer weiteren Gruppe mit COPROG-Luciferase Plasmid konnte analog auch eine Reporter Gen Expression über die Versuchsdauer erreicht werden. Diese Versuche von Schillinger et al. unterstreichen, dass eine Verbesserung der Transgenexpression mittels CORPOG nötig ist, da die Ergebnisse *in-vivo* keine Langzeiteffekte der BMP-2/COPROG Transfektion von Chondrozyten zeigten. Möglicherweise waren die Expressionslevel und die Expressionskinetik nicht ausreichend. In der verwendeten Form kann die Fibrinogen-COPROG-BMP-2 Präparation allerdings gut analog zum häufig verwendeten Fibrinkleber eingesetzt werden.

#### 4.1.5 Dosis- und Applikationsart

Die applizierte Gendosis ist ein weiterer Faktor, den es zu beachten gilt. In früheren Versuchen von Zegzula et al. mit rekombinantem BMP-2 zeigte sich dosis- und zeitabhängig verschieden starke Knochenneubildung<sup>218</sup>. Diese Effekte konnten allerdings nur bis zu einer Versuchsdauer von 4 Wochen beobachtet werden, danach war die Neubildung unabhängig von der Zeit- und Dosis. Im vorliegenden Versuch waren vier Wochen die minimale Versuchsdauer. So könnte die Dosis zu gering gewesen sein. 84µg war die im vorliegenden Versuch verwendete Dosis, die bei jedem Tier der entsprechenden Versuchsgruppe vollständig in den Markraum appliziert wurde. Lutz et al. erreichten die positiven Resultate bei der Implantateinheilung mittels viralem Gentransfer mit 12µg BMP-2<sup>193</sup> pro Applikation. Keine verbesserte Implantatinkorporation zeigten Baas et al. im Versuch mit 0,45mg rekombinantem BMP-2<sup>194</sup>. Ähnlich waren die Ergebnisse von Jeppsson et al., dort kamen Dosen des rekombinanten Proteins von 30ng bis zu 4µg zum Einsatz<sup>191, 192</sup>. Der Vergleich der Dosis ist allerdings nur sehr eingeschränkt möglich, da beim einen Mal das rekombinante Protein verabreicht wurde, beim anderen Mal unterschiedliche Methoden des Gentransfers zur Anwendung kamen. Bei *in-vivo* Versuchen mit viralen Vektoren im Kleintiermodell konnten Baltzer et al. zeigen, dass adenoviral transduzierte Zellen BMP-2 im Nanogramm Bereich produzierten und Knochen neu gebildet wurde, während mit rekombinantem BMP-2 Mikrogrammdosen für den gleichen Effekt benötigt wurden<sup>219</sup>. Diese Erkenntnis stützt die Annahme, dass die viralen Transduktionsmethoden effizienter sind als die Gabe des

rekombinanten Proteins. Obwohl bekannt ist, dass in der Gentherapie die nicht-viralen Methoden den viralen in der Effizienz bisher unterlegen sind<sup>122</sup>, ist die Frage nach der adäquaten Dosis bei nicht-viralen Transfektionsmethoden bisher ungeklärt.

Luginbuehl et al. hypothesieren, dass eine speziesspezifische Dosis nötig sei um eine zelluläre Antwort auf appliziertes rekombinantes BMP-2 zu erhalten mit der Annahme, dass die Knochenumbaurate verschieden sei<sup>220</sup>. Im Bezug auf verschiedene Tiergrößen scheint diese Vermutung logisch. Viel entscheidender ist aber möglicherweise die Beziehung der applizierten Dosis zur Größe des behandelten Defekts oder zum Gewicht des Tieres, was experimentell noch erforscht werden muss. Zur Lösung des Dosierungsproblems tragen Koh et al. in einem Versuchsansatz bei, indem sie zur Steuerung des zeitlichen Ablaufs und der besseren Dosissteuerung einen Tetrazyklin-sensitiven Promoter entwickelten, der gezielt Kontrolle über die Expression *in-vivo* ermöglichte<sup>221</sup>.

Die Applikationsart im hier präsentierten Versuch war in allen Gruppen gleich. Über den in der orthopädischen Chirurgie häufig genutzten Zugang über der Tuberositas tibiae war die Markhöhle für die orthograde Implantation des Marknagels und Fibrinkleber sowie Plasmidapplikation gut exponiert. Es wurde für die Versuchsgruppen die gleiche Menge und Konzentration des Fibrins genommen wie für die Kontrollgruppe.

## 4.2 Diskussion der Methoden

### 4.2.1 Tiermodell

Ist die Entscheidung für den Tierversuch getroffen, ist die nächste Wahl die der Tierspezies. Diese unterscheiden sich besonders im Punkt der skelettalen Wachstumsgeschwindigkeit und Regenerationsfähigkeit. Beim Kaninchen laufen diese Prozesse schneller ab als beim Menschen. Das ergibt einen Vorteil bei der Wahl der Untersuchungszeiträume, da diese kürzer gewählt werden können. Die uneingeschränkte Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist allerdings fraglich. *In-vitro*-Versuche und Tierversuche repräsentieren nur begrenzt die Situation der Patienten. Die Tiere sind meist jung, haben selten Komorbiditäten, und es ist nicht klar, ob Wachstumsfaktoren in unterschiedlicher Geschwindigkeit bei Tier oder Mensch verstoffwechselt werden<sup>222</sup>. Unter Umständen sind beim älteren Patienten weniger Stammzellen verfügbar als bei jüngeren Versuchstieren. Untersuchungen zur Übertragbarkeit stammen aus der Gruppe Diefenderfer et al., die wesentlichen Unterschiede in der Regulation des BMP-Signalwegs und im Mechanismus zur Regulation der alkalischen Phosphatase bei humanen Knochenmarkzellen fanden und einen Unterschied zwischen humanen und murinen Zellen vermuten<sup>223</sup>. Die maximale biomechanische Belastbarkeit des Knochens bei kleinen Tieren mit wenigen Osteonen bzw. weniger oder keinen Havers-Systemen wird viel früher erreicht als beim Menschen.

Bei der kritischen Interpretation der aus Tierexperimenten zur Knochenheilung gewonnenen Daten muss die Wahl des Tiermodells und dessen Einfluss auf die zu testende Therapiestrategie berücksichtigt werden. Einhorn postuliert drei wesentliche Kriterien für die Modelluntersuchungen<sup>224</sup>: (1) Im Experiment sollen die pathologisch auf den Organismus einwirkenden Bedingungen effektiv die klinischen Gegebenheiten imitieren. (2) Spontanheilung soll ausgeschlossen sein. (3) Das zu testende Modell soll sich selektiv anderen Therapiemöglichkeiten überlegen zeigen.

Die vielen positiven Ergebnisse aus Kleinterversuchen müssen vorsichtig auf ihr therapeutisches Potenzial untersucht werden. Während es vergleichsweise einfach gelingt, ektope Knochenbildung durch BMPs im Mausmodell zu induzieren, ist es schwer, gleiche Resultate im Großtiermodell zu erzielen<sup>225</sup>. Bisher ist die erfolgreiche experimentelle gentherapeutische Behandlung in relativ einfachen Tiermodellen erreicht worden und muss

sich erst in größeren Modellen bewähren. Die Tatsache, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine klinische gentherapeutische Phase-I Studie zur Knocheninduktion gibt, zeigt die Notwendigkeit für weitere Grundlagenforschung.

Die Wahl einer bestimmten Tierspezies ermöglicht die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in qualitativer und quantitativer Hinsicht mit denen anderer Arbeitsgruppen. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist auch die bekannte Herkunft der Tiere von Vorteil. Die Tierzucht gewährleistet die Verwendung von Tieren mit gleichem genetischem Hintergrund. Unkomplizierte und gute Haltungsmöglichkeiten sind weitere Vorteile. Der unkomplizierte chirurgische Eingriff im vorliegenden Versuch konnte so an bis zu vier Tieren pro Tag vorgenommen werden. Die annähernde Gleichaltrigkeit der Tiere bedeutet eine noch bessere Vergleichbarkeit. Das angewendete Tiermodell mit Implantation eines intramedullären Kraftträgers und anschließender biomechanischer und histologischer Auswertung ist in vielen Studien und mit vielen Tierarten etabliert<sup>226</sup>. Dieses Modell findet Anwendung zur Überprüfung von lebenden Knochen unter physiologischen Lastbedingungen. Einschränkungen müssen, wie erwähnt, bei der Übertragbarkeit auf den Menschen gemacht werden.

Bei New Zealand White Rabbits der verwendeten Altersspanne beträgt die Länge der Tibia etwa 9-10 cm bei 0,5-2 cm Breite, je nach Höhe der Messung. Der Durchmesser des Markraums beträgt in der Regel 2,5-3 mm. Dies entspricht in etwa dem Durchmesser des größten verwendeten Bohrers. Rechnerisch hat der Markraum ein Volumen von etwa 320 mm<sup>3</sup>, das vom errechneten Volumen des Titannagels mit etwa 240mm<sup>3</sup> unterboten wird. Diese Tatsache rechtfertigte im Besonderen die Wahl der Kaninchenspezies, da im Kleintiermodell, z.B. Ratte, der Markraum zu klein gewesen wäre, um zusätzlich zum Implantat relevante Mengen an Fibrinkleber und Genmaterial zu applizieren. Im vorliegenden Versuchsvorhaben konnte die prinzipielle Anwendbarkeit dieses Versuchsaufbaus demonstriert werden. Es gilt den „proof of Principle“ zu demonstrieren; dann kann das Modell auf ein größeres Tiermodell übertragen werden. Anderenfalls sind Modifikationen der Versuchsparameter nötig.

Eine andere wichtige Entscheidung betrifft die Gruppengröße. Die statistische Auswertung verlangt für aussagekräftige und repräsentative Ergebnisse eine gewisse Fallzahl im Tierexperiment. Damit sollen individuelle Besonderheiten und der Zufallsfaktor zur korrekten

Auswertung der Ergebnisse weitgehend reduziert werden. Die Gruppengröße wurde nach statistischen Empfehlungen gewählt, und es konnte auf Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden.

#### 4.2.2 Biomechanik und Belastungsbedingung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein etabliertes unbelastetes Tierversuchsmodell angewendet. Dazu wurde den New Zealand White Rabbits ein Titannagel in beide Tibiae mit oder ohne Fibrinkleber und dem BMP-2 Plasmid im nicht-viralen Vektor implantiert. Das Modell einer kombinierten mikromorphologischen, histologischen und biomechanischen Testung von Oberflächen und Implantaten sieht die orthograde Implantation von Testkörpern in die kortikalisreiche Tibia vor. Interindividuelle und intraindividuelle Vergleiche sind durch beidseitige Operation bei gleicher Behandlung sowie unterschiedliche Untersuchungsmethoden gewährleistet. Daraus resultiert eine nicht zuletzt aus ethischer Sicht wünschenswerte Reduktion der zu operierenden Tiere. Push-out Tests sind in der orthopädischen Forschung etabliert, waren aber nicht immer unumstritten<sup>227</sup>. Implantatfixierung geschieht hierbei durch Reibung, Verriegelung, und chemische Bindung. Sind sowohl die Implantatoberfläche als auch der Knochen komplett glatt geformt, ist die Reibung der Hauptparameter bei der Fixierung. Das trifft allerdings beim biologischen Knochenmodell nicht zu. Der Push-out Test misst die Stärke der Grenzfläche von Knochen und Implantat. Beim Push-out Test werden die teilweise lokal auftretenden Verklebungseffekte durch die mathematische Mittelung bei der Scherkraftberechnung auf die gesamte Knochen-Implantat Kontaktstrecke verteilt. Nur wenn sich diese Verklebungen gleichmäßig auf die Strecke verteilen, sind sie in der errechneten Scherkraft repräsentiert. Dadurch beeinflusst der Push-out Test durch die Belastungsverteilung an der Grenzfläche das gemessene Ergebnis<sup>228</sup>. Untersuchungen haben demonstriert, dass dieser Test nicht nur die eigentliche Scherkraft ermittelt<sup>229, 230</sup>. In kritischen Untersuchungen dieser Methode wurde interessanterweise keine Korrelation von histomorphometrisch beobachteter Knochen-Implantat Kontaktstrecke und der benötigten push-out Kraft<sup>231</sup> festgestellt, was man vermuten könnte. Neuere Beobachtungen von Dayer et al. lassen allerdings gegenteilige Schlüsse zu<sup>232</sup>. Ungleiche Kraftverteilung entlang des Implantats ist schon Beweis für das Fehlen einer

linearen Korrelation von Kontaktstrecke und aufzuwendender Lockerungskraft. Bestätigt wurde dies mit der Beobachtung, dass die biomechanischen Charakteristika entlang der Kontaktstrecke<sup>233</sup> variieren. Auch demonstrierten Dhert et al.<sup>234</sup> in einer Studie, dass die Kortikalisdicke und der Implantatdurchmesser wenig Einfluss auf den Ausgang des Tests haben. In eigenen Studien aus der Arbeitsgruppe konnte nichtsdestotrotz eine gute Vergleichbarkeit der gewonnenen biomechanischen Daten sowie der histologischen Auswertung gezeigt werden<sup>235, 236</sup>. Ein Test, der die gemeinsam auftretenden Scher-, Biegungs-, und Druckkräfte gleichermaßen prüfen kann, existiert nicht. Eine mögliche Alternative ist der Drehmoment-Test. Hierbei wird das benötigte Drehmoment zum Entfernen eines schraubenförmigen Implantats gemessen<sup>237</sup>. Erschwerend bei der Drehmomentberechnung wirkt sich zusätzlich zur unterschiedlichen Materialbeschaffenheit die Gewindegeometrie aus, was Vergleichbarkeit und klinische Übertragbarkeit reduziert.

Beim vorliegenden Versuch wurde die Push-out - Technik unter Beachtung der Bedingungen, die von Dhert et al. und Harrigan et al. beschrieben wurden, durchgeführt, um sinnvolle Ergebnisse zu gewinnen. Wichtige Parameter, die es zu beachten gilt, sind dabei der Durchmesser des Implantats und des ihn umgebenden Knochens, der Durchmesser der Leitschiene für das auszudrückende Implantat und das Elastizitätsmodul des Implantats<sup>234</sup>. Ähnlich wichtig erachten Harrigan et al.<sup>228</sup>, dass das Implantat ungestört die Versuchsvorrichtung passieren kann, sowie die Berücksichtigung der Länge des Testobjekts und dessen Durchmesser. Im Versuchsaufbau hatte der Elastizitätsmodul der Testvorrichtung, in die das Knochen-Implantat Konstrukt eingebettet wurde, durch das synthetische Material bei der mechanischen Testbelastung sicherlich auch Einfluss auf das Testergebnis. Durch die standardisierte Testung der Konstrukte in Serie blieb der Einfluss allerdings konstant und ist als mögliche Fehlerquelle vernachlässigbar. Weiteren Störeinflüssen, wie der Verkantung von Testobjekten, wurde durch streng lineares Einbringen entgegengewirkt. Solche Effekte können möglicherweise Erklärung für Ausreißer in den Testserien sein. Die untere Öffnung wurde bewusst breit genug gewählt, um bei festem Sitz des Knochens eine kontaktlose Passage des ausgedrückten Implantats zu ermöglichen. Die Wahl des Vorschubs der Materialprüfmaschine bei der Testung entsprach den Empfehlungen<sup>231</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde weitgehend die reale Umgebung einer Endprothese simuliert. Dennoch gibt es Einschränkungen. Das Wolff'sche Gesetz besagt, dass Knochen

belastungsabhängig adaptiert<sup>1, 238</sup>. In Phasen stärkerer mechanischer Druck- oder Zugbelastung wird die Knochenarchitektur durch anabolen Stoffwechsel verstärkt, belastungsarme Phasen haben eine katabole Knochenstoffwechsellage zur Folge. Für die Einheilung einer Endoprothese und das Implantatdesign bedeutet dies konkret, dass die physiologische Belastungssituation durch das Implantat weder übermäßig gesteigert noch gemindert wird, um die normale Knochenarchitektur wieder herstellen zu können<sup>1</sup>. Das Implantat wurde im vorliegenden Versuch unter unbelasteten Einheilungsbedingungen untersucht. In der Literatur findet sich sowohl Information über belastete als auch unbelastete Einheilungsbedingungen bei der tierexperimentellen Untersuchung von Implantatoberflächen. Die Ergebnisse zeigen besseres Einwachsen bei der belasteten Situation<sup>239</sup>. Durch die unbelastete Situation werden die realen Bedingungen einer Endoprothese unvollständig simuliert, da besonders auf Prothesen der unteren Extremitäten ein Mehrfaches des Körpergewichts lastet. Andererseits bietet das in diesem Versuchsvorhaben getestete intramedulläre Modell gegenüber dem in der Literatur häufig beschriebenen transkortikalen Modell den Vorteil, dass der Knochen-Implantat Kontakt hauptsächlich am diaphysären Endost und den metaphysären Trabekeln stattfindet und sich damit der klinischen Situation in der Endoprothetik besser annähert. Vor diesem Hintergrund fiel die Entscheidung für das unbelastete Modell, um die prinzipielle Machbarkeit, wie auch den Sicherheitsaspekt untersuchen zu können.

Die Testung der Implantate geschah innerhalb der ersten zwei Stunden nach Explantation und wurde nur durch die Vorbereitung der Knochen verzögert. Bei Jerosch et al. hatte die Wahl des Konservierungsverfahrens bei humanen Femurproben keinen nachweisbaren Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften oder die Knochenstruktur<sup>240</sup>. Die Vergleiche der einzelnen Gruppen weisen teilweise erhebliche Schwankungen in der aufzuwendenden Kraft im Auspressversuch und der daraus ermittelten Scherkraft auf. Als Grund hierfür kann, trotz relativ konstanter Länge und standardisierter Entnahme, Präparation und Testung der Knochen, die Individualität der einzelnen Tiere in biologischer Hinsicht gesehen werden. Die Versuchstiere hatten jedoch bei Operation vergleichbares Alter, waren, wie erwähnt, gleichen Geschlechts und zeigten phänotypisch keine relevanten individuellen Auffälligkeiten.

Neben der Art der Intervention gab es keine methodischen Gruppenunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen.



### 4.2.3 Radiologische Untersuchung

Die Röntgenaufnahmen der Tibiae wurden unmittelbar postoperativ angefertigt. Die Auswertung erfolgte deskriptiv, der subjektive Eindruck zählte. In der konventionellen projektionsradiographischen Aufnahme ist die genaue Beurteilung eines heilenden Knochens meist schwierig<sup>241, 242</sup>. Sämtliche Anteile der Knochenstruktur, insbesondere der Kallus, werden in der Darstellung überlagert. Mikroradiographische Untersuchungen hätten die Untersuchungsmethodik deutlich verfeinert und eventuelle Einheilungsunterschiede offenbart und vergleichbar gemacht. Für die Fragestellung der gegenwärtigen Arbeit war jedoch in erster Linie der Ausschluss einer Fraktur oder sonstiger morphologischer Auffälligkeiten notwendig, wofür eine konventionelle Röntgenaufnahme ausreichte.

Die radiographischen Untersuchungen zeigten beim vorliegenden Versuch bei allen Gruppen dichten Knocheneinbau des Implantats. Somit gab es Anhaltspunkte für eine gute knöcherne Integration. Ein weiterer wesentlicher Punkt ist, dass keine ektopische Knochenbildung beobachtet wurde.

Das angefertigte Messprotokoll zeigte als generellen Trend eine Durchmesserzunahme der Knochen, die allerdings, weil sie unregelmäßig über alle Gruppen und Messpunkte verteilt ist, keine Rückschlüsse auf Gruppenunterschiede rechtfertigen würden. Da sich sechs der acht Signifikanzen bei den Wachstumszunahmen in den BMP-2 Gruppen feststellen ließen, kann spekuliert werden, dass ein erhöhtes Knochenwachstum stattgefunden hat, das jedoch ohne verbesserte Implantateinheilung vonstatten ging. Die Auswertung fand verblindet statt, wurde aber manuell am Röntgenbild vorgenommen. Daher beinhaltet diese Methode Potenzial für Messfehler und die Ergebnisse sollten vorsichtig interpretiert werden. Eine geläufige Erklärung wäre physiologischer Knochenzuwachs, da sich die Kaninchen im Untersuchungszeitraum im Wachstum befanden. Dennoch war durch die Homogenität des Versuchstierkollektivs eine ausreichende Vergleichbarkeit und Überprüfbarkeit der gestellten Hypothese gewährleistet.

### 4.3 Klinische Relevanz und Ausblick

Die zunehmende Lebenserwartung und die damit verbundene Zunahme von altersbedingten Knochenbrüchen und Implantatbedürftigkeit erfordert es, dem verstärkten Bedürfnis für gute Lebensqualität im Alter gerecht zu werden. Die Therapie mit rekombinanten Proteinen hat zwar bereits ein breites Anwendungsfeld, dennoch sind noch offene Fragen Gegenstand intensiver Forschung. Umfangreiche Grundlagenforschung und Tierversuche haben zur beschränkten klinischen Zulassung einiger BMPs geführt. Bis Ende 2007 sind bereits fast eine Millionen Menschen mit BMPs (BMP-2 und BMP-7) in Form des rekombinanten Proteins aufgrund verschiedener Indikationen behandelt worden<sup>243</sup>. Die therapeutische Anwendung rekombinanter Proteine am Patienten beschränkte sich bisher auf BMP-2 und BMP-7 mit kollagenem Trägermaterial. Attraktiver und preiswerter wäre jedoch der Einsatz von Wachstumsfaktor kodierenden Plasmiden. In der Orthopädie und Unfallchirurgie ist die gute operative Zugänglichkeit des Zielgewebes für eine lokale Therapie von Vorteil. In der kombinierten Anwendung von etablierten orthopädischen und unfallchirurgischen Implantaten mit einer Gentherapie könnten Frakturheilung und Implantateinheilung beschleunigt und verbessert und die Komplikationsrate gemindert werden. Sehr wahrscheinlich werden zukünftig durch Neuentwicklungen im „tissue-engineering“ viele Materialien für verschiedene klinische Anwendungen als Trägermaterial für BMPs zur Verfügung stehen.

Allerdings bleiben trotz der Evidenz für die knocheninduktiven Eigenschaften der BMPs noch viele Fragen offen. Dosis, Trägermaterial und der Zugangsweg zum Knochengewebe müssen experimentell weiter optimiert werden, da die beeindruckenden Resultate in Tierversuchen beim Menschen nur schwer zu reproduzieren sind. So hat die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation etliche Limitierungen. Lokale Knochenheilung ist unter anderem das Ergebnis eines Induktionsprozesses durch viele BMPs und ihrer Feedbackmechanismen. Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine hohe Redundanz zwischen den einzelnen BMPs. Daher könnte die Konzentration wichtiger sein als ein spezifisches BMP. Die weitere molekulare Charakterisierung der Signaltransduktionskaskade kann zum Verständnis des biologischen Feedback-Mechanismus bei der Knochenheilung beitragen und den gentherapeutischen Ansatz verfeinern. Die komplexe Regulation der Knochenheilung könnte womöglich durch eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren, die simultan oder sequentiell appliziert werden, gefördert werden<sup>115</sup>.

Will man die Knochenheilung durch die Gabe exogener Faktoren beschleunigen, wird möglicherweise eine Gentherapie benötigt, die eine Gruppe von Genen beinhaltet, um der Vielzahl der bei der physiologischen Knochenheilung involvierten Gene und Faktoren gerecht zu werden<sup>244</sup>.

Hinsichtlich des Sicherheitsbedürfnisses bei der Gentherapie muss ein Schwerpunkt die Erforschung der Risiken sein. Das gilt insbesondere für die Anwendung bei Patienten in der nicht-letalen muskuloskeletale Chirurgie. Durchführbarkeit und Sicherheit sind gleich zu gewichten.

In neueren Arbeiten wird vorgeschlagen, das bisherige Dreieckskonzept notwendiger Faktoren der Knochenheilung, bestehend aus mesenchymalen Stammzellen, osteokonduktivem Gerüst und Wachstumsfaktoren um einen vierten Punkt, nämlich die mechanische Stabilität einer Fraktur<sup>245</sup> (Diamant-Konzept) und einen fünften Punkt, die Vaskularisation einer Fraktur<sup>246</sup> (Pentagon-Konzept), zu erweitern. Damit wird in der Forschung zur Knochenheilung zunehmend der biomechanische Aspekt gleich wichtig wie der biologische.

## 5 Zusammenfassung

Weltweit werden jedes Jahr über 2 Mio. Gelenke durch eine Total- oder Hemiendoprothese ersetzt. Nach Implantation einer Hüftendoprothese kommt es in den ersten drei Monaten zum Knochenverlust von bis zu 14%. In der Folge treten bei vielen Patienten Prothesenlockerungen oder Infektionen auf, die einen erneuten Eingriff unabwendbar machen. Wechseloperationen sind mit größerem Blutverlust, längerer Eingriffsdauer und einer Zunahme von Komplikationen verbunden, die auch die Mortalität erhöhen. Die demographischen Daten sprechen weltweit für eine Zunahme der Indikationen für Gelenkersatz. Schätzungen zufolge wird die Zahl der häufig benötigten Prothesenoperationen in Deutschland jährlich um 3-5% ansteigen. Ein volkswirtschaftlicher Kostenanstieg und die psychologische Belastung für die Patienten sind mögliche Folgen. Schlecht einheilende Prothesen, periprothetische Frakturen und Implantatlockerung mit anschließender Revision machen eine Optimierung der Implantateinheilung notwendig. Osteoinduktive Zytokine sind seit Urist' Entdeckung der BMPs erforscht worden. BMP-2 und BMP-7 sind klinisch zugelassen und werden als rekombinant hergestellte Proteine verabreicht. Ein anderer Ansatz in der Applikation ist die Gentherapie. Dazu wird das für den Wachstumsfaktor kodierende Gen in das Zielgewebe eingeschleust. Die Zellen exprimieren das therapeutische Protein unmittelbar im Zielgewebe und somit örtlich und zeitlich limitiert. Für die klinische Anwendung bei der unzementierten Endoprothetik wäre diese Form des Gentransfers optimal, da hauptsächlich der Peri-Implantatknochen als Zielgewebe betroffen ist und die unerwünschten Nebenwirkungen reduziert werden könnten. In der Gentherapie werden die nicht-viralen Vektoren kontinuierlich verbessert. Eine Neuentwicklung sind sogenannte COPROGs. Dabei wird die DNA, kodierend für den Wachstumsfaktor BMP-2, mit dem häufig verwendeten PEI (Polyethylenimin) komplexiert und von einem Schutzpolymer umhüllt. In einer tierexperimentellen Studie wurden 64 Kaninchen (New Zealand White Rabbit) in 4 Gruppen aufgeteilt und beidseitig an der Tibia mit Implantation eines Titannagels operiert. Gruppe I galt als Kontrollgruppe mit einfacher Implantation des Titannagels. Gruppe II war die erste Versuchsgruppe mit zusätzlicher Fibrinkleberapplikation. Gruppe III stellte die zweite Versuchsgruppe dar mit Implantatimplantation und kombinierter Fibrinkleber-BMP-2-Plasmid Applikation. Für die Sicherheitsuntersuchung, d.h. insbesondere zum Ausschluss einer systemischen Transfektion, diente die Gruppe IV. Einziger Unterscheid zur

Gruppe III war, dass das Plasmid für ein Reportergen anstelle von BMP-2 kodiert. Untersucht wurden in den Gruppen I-III zwei Behandlungszeiträume, 28 oder 56 Tage. In der Gruppe IV gab es vier Untersuchungszeitpunkte, 3,7,28 oder 56 Tage. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen der Tiere aus den Gruppen I-III vorgestellt. Dazu wurde der push-out Test verwendet. Es erfolgte eine zusätzliche Bestimmung der Blut- und Serumparameter bei allen Tieren und eine radiographische Analyse der postoperativ und post mortem erstellten Röntgenbilder. Die statistisch ausgewerteten Daten zeigten eine signifikante Zunahme der Implantateinheilung in der Kontrollgruppe von Tag 28 zu Tag 56. Dies war auch bei der BMP-Plasmid Gruppe zu erkennen, jedoch war wie bei der Fibrin Gruppe der Unterscheid von Tag 28 zu Tag 56 nicht signifikant. Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte keinen signifikanten Einheilungsunterschied zwischen der Kontroll- und der Fibrin Gruppe an beiden Untersuchungszeiträumen. Die BMP-2-Applikation resultierte in einer verminderten biomechanischen Festigkeit des Implantats im Knochen beim push-out Test. Die Auswertung der Röntgenbilder zeigte eine generelle Zunahme der Knochendicke, die jedoch nicht mit der biomechanischen Festigkeit korrelierten. Die bestimmten Blut- und Serumparameter blieben gruppenübergreifend im Verlauf unauffällig. Bedeutsam war die durch den Nachweis des Reportergens in verschiedenen Organen gewonnene Erkenntnis, dass eine systemische Transfektion stattgefunden hatte. Dieser Aspekt muss Gegenstand weiterer Forschung sein. Möglicherweise wurde der Fibrinkleber inklusive BMP-2 Genvektor durch den intramedullären Druck bei der Applikation des Implantats in den Markraum aus diesem herausgepresst und konnte sich über die Blutbahn systemisch verteilen. Die prinzipielle Anwendbarkeit von Fibrinkleber wurde gezeigt, da kein retardierender Effekt auf die Einheilungsdauer und keine verminderte Festigkeit festgestellt wurde. In diesem Versuch war der Gentransfer des BMP-2 Plasmids im neu entwickelten nicht-viralen Vektor mit Fibrinkleber als Trägermaterial zwar erfolgreich, brachte jedoch keine biomechanischen Vorteile. Im Gegenteil zeigten die biomechanischen Resultate, dass das Implantat in der BMP-2-Versuchsgruppe verglichen mit der Fibrin Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe deutlich schlechter inkorporiert wurde. Diese Erkenntnis kontrastiert das bisherige Verständnis der biologischen Wirkung von BMP-2, einem Protein mit stark osteoinduktivem Potential. In der Frakturheilung zeigen BMPs eine deutliche Stimulation der Heilungsprozesse. Eine mögliche Erklärung für den negativen Effekt von BMP-2 bei der Implantateinheilung könnte eine unterschiedliche Knochenbildung sein. Im vorliegenden

Versuch geschah das Knochenwachstum direkt um das Implantat, anders als im Frakturmodell, wo Knochenbildung über die Zwischenstufe der Knorpelbildung geschieht. Die Ergebnisse der noch nicht abgeschlossenen histologischen Untersuchung werden weitere Erkenntnisse bringen und das Bild vervollständigen.

Um die komplexe biologische Wirkung von BMP-2 auf die Knochenheilung und die ihr zugrunde liegenden Mechanismen aufzuschlüsseln, bedarf es weiterer Forschung mit dem Ziel, neue und sichere Behandlungsstrategien für die klinische Anwendung zu entwickeln.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

AO = Arbeitsgemeinschaft für Osteosyntheseklassifikationen

BM = Basalmembran

BMP = Bone Morphogenetic Protein

FDA = Food and Drug Administration

FGF-2 = Fibroblast Growth Factor-2

MPa = Megapascal,  $1 \text{ Pa} = 1 \frac{\text{N}}{\text{m}^2} = 1 \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}^2}$

p.a. = posteriore-anteriore

PEI = Polyethylenimin

Push-out Test = Auspressversuch

rh = rekombinant human

Tab. = Tabelle

TEN = Titanelastischer Nagel

TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor beta

SD = Standardabweichung

Tsd. = Tausend

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

WHO = World Health Organization

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre Wirkung von BMP und TGF- $\beta$ (nach Termaat <i>et al.</i> 2005 <sup>75</sup> , ©JBJS) ..	9
Abbildung 2: Verschiedene Möglichkeiten der Gentherapie (nach Hallek <i>et al.</i> 1999 <sup>108</sup> ).....	13
Abbildung 3: Gentherapie zur Beeinflussung der Knochenheilung (nach Betz <i>et al.</i> 2006 <sup>109</sup> )	13
Abbildung 4: Bildung von „ <i>Copolymer Protected Gene Vectors</i> “ aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen PEI/pDNA-Komplexen und negativ geladenen „ <i>Protective Copolymer</i> “ (PROCOP) (nach D. Finsinger <sup>138, 140</sup> ).....	17
Abbildung 5: Zellulärer Mechanismus der DNA Aufnahme .....	18
Abbildung 6: Struktur des BMP-2 Plasmids .....	27
Abbildung 7: Scheren und Enthaaren der Tibia    Abbildung 8: Intubation.....	29
Abbildung 9: Steriles Einpacken    Abbildung 10: Hautschnitt.....	30
Abbildung 11: Vorbohren des Markraums    Abbildung 12: Applikation in den Markraum....	30
Abbildung 13: Implantation des Titannagels    Abbildung 14: Hautnaht.....	30
Abbildung 15: Röntgen seitlich und p.a.....	31
Abbildung 16: Testvorrichtung „push out“ Test (ohne Deckplatte).....	34
Abbildung 17: Zwick <sup>®</sup> Materialprüfmaschine    Abbildung 18: Stempel und Einbettform ....	35
Abbildung 19: Beispielmesskurve. Die applizierte Kraft [N] auf der Ordinate ist über dem zurückgelegten Weg [mm] auf der Abszisse aufgetragen. ....	46
Abbildung 20: Kontrollgruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Nach 56 Tagen zeigte sich eine signifikant höhere Scherkraft.....	47



Abbildung 21: Fibringruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Scherkraft. .... 48

Abbildung 22: BMP-2 Gruppe: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Scherkraft. .... 49

Abbildung 23: Gruppenübersicht: Vergleich der Scherkräfte vom Push-out Test nach 28 und 56 Tagen in allen Gruppen. Höchste Scherkraft in der Kontrollgruppe nach 56 Tagen, die BMP-2 und die Fibringruppe zeigten signifikant weniger Scherkraft. .... 51

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologische Modelluntersuchungen mit Fibrinformulierung.....	20
Tabelle 2: Gruppeneinteilung und Versuchsplan.....	25
Tabelle 3: Blutwerte (Mittelwert und Standardabweichung).....	41
Tabelle 4: Körpergewichte, Mittelwert und Standardabweichung (*p= <0,05, Studentischer T-Test).....	42
Tabelle 5: Von den Röntgenbildern erhobene Werte der maximalen proximalen und distalen Breite, sowie der minimalen diaphysären Breite von beiden Tibiae [mm], Mittelwerte und Standardabweichung (*p= <0,05, Studentischer T-Test).....	44

## 9 Literaturverzeichnis

1. Wolff J. Concerning the interrelationship between form and function of the individual parts of the organism. By Julius Wolff, 1900. Clin Orthop Relat Res 1988;2-11.
2. Willestaedt H, Levander G, Hult L. Studies in osteogenesis. Acta Orthop Scand 1950;19:419-32.
3. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150:893-9.
4. Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS. Inductive substrates for bone formation. Clin Orthop Relat Res 1968;59:59-96.
5. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. J Dent Res 1971;50:1392-406.
6. De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. Injury 2005;36 Suppl 3:S43-6.
7. Carlisle E, Fischgrund JS. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. Spine J 2005;5:240S-9S.
8. Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung [www.bqs-online.com](http://www.bqs-online.com) 2006.
9. Statistisches Bundesamt. [www.destatis.de](http://www.destatis.de) 2006.
10. Venesmaa PK, Kroger HP, Miettinen HJ, Jurvelin JS, Suomalainen OT, Alhava EM. Monitoring of periprosthetic BMD after uncemented total hip arthroplasty with dual-energy X-ray absorptiometry--a 3-year follow-up study. J Bone Miner Res 2001;16:1056-61.
11. Herberts P, Malchau H. Long-term registration has improved the quality of hip replacement: a review of the Swedish THR Register comparing 160,000 cases. Acta Orthop Scand 2000;71:111-21.
12. Mahomed NN, Barrett JA, Katz JN, et al. Rates and outcomes of primary and revision total hip replacement in the United States medicare population. J Bone Joint Surg Am 2003;85-A:27-32.
13. Haas S. [Thrombosis in trauma and orthopedic surgery. Prevention, diagnosis, therapy]. Unfallchirurg 1997;100:307-19.
14. Starr AJ. Fracture repair: successful advances, persistent problems, and the psychological burden of trauma. J Bone Joint Surg Am 2008;90 Suppl 1:132-7.
15. The Bone And Joint Decade MP. [www.boneandjointdecade.org](http://www.boneandjointdecade.org).

16. Rahal MD, Branemark PI, Osmond DG. Response of bone marrow to titanium implants: osseointegration and the establishment of a bone marrow-titanium interface in mice. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1993;8:573-9.
17. Rubin C RJ. Chapter 6. Biomechanics and Mechanobiology of Bone. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 2006;Vol. 6th ed.:36-42:Washington, D.C.: The American Society for Bone and Mineral Research.
18. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006;354:2250-61.
19. Sandberg MM. Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components. *Ann Med* 1991;23:207-17.
20. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14 Suppl 3:S35-42.
21. Novicoff WM, Manaswi A, Hogan MV, Brubaker SM, Mihalko WM, Saleh KJ. Critical analysis of the evidence for current technologies in bone-healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90 Suppl 1:85-91.
22. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31:357-74.
23. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999;30:591-8.
24. Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics* 2002;25:1301-9; quiz 10-1.
25. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery* 2001;71:354-61.
26. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:454-64.
27. Liu H, Slamovich EB, Webster TJ. Increased osteoblast functions among nanophase titania/poly(lactide-co-glycolide) composites of the highest nanometer surface roughness. *J Biomed Mater Res A* 2006;78:798-807.
28. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14:1805-15.
29. Einhorn TA, Trippel SB. Growth factor treatment of fractures. *Instr Course Lect* 1997;46:483-6.

30. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:413-7.
31. Haas NP. [Callus modulation--fiction or reality?]. *Chirurg* 2000;71:987-8.
32. Evans CH. John Hunter and the origins of modern orthopaedic research. *J Orthop Res* 2007;25:556-60.
33. Connolly JF, Shindell R. Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J* 1986;71:105-7.
34. 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;5:753-9.
35. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S7-21.
36. Ai-Aqi ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008;87:107-18.
37. Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract* 1992;188:1104-21.
38. Klaushofer K, Peterlik M. [Pathophysiology of fracture healing]. *Radiologe* 1994;34:709-14.
39. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:165-70.
40. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995;13:357-67.
41. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994;9:651-9.
42. Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998;22:410-6.
43. Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 1999;65:83-9.
44. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996;19:1S-12S.

45. Fujimoto R, Tanizawa T, Nishida S, et al. Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab* 1999;17:11-7.
46. Sakai R, Miwa K, Eto Y. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone* 1999;25:191-6.
47. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* 1998;13:1483-90.
48. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson JO, Isaksson OG. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 1986;250:E367-72.
49. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998;283:2-37.
50. Lind M, Bunger C. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J* 2001;10 Suppl 2:S102-9.
51. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1994;65:37-41.
52. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Peterson L, Isaksson O. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1987;40:91-6.
53. Aspenberg P, Lohmander LS. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:473-6.
54. Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990;21:199-209.
55. 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;74:659-70.
56. Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 2003;4:763-73.
57. Rosen V, Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 1992;8:97-102.
58. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res* 2002:4-10.

59. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *Journal of periodontal research* 1994;29:225-35.
60. Lecoœur L, Ouhayoun JP. In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells. *Biomaterials* 1997;18:989-93.
61. Wharton KA, Thomsen GH, Gelbart WM. Drosophila 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9214-8.
62. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000;15:663-73.
63. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, et al. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 1999;140:2125-33.
64. Israel DI, Nove J, Kerns KM, et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 1996;13:291-300.
65. 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;85-A:1544-52.
66. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 1987;18:207-12.
67. 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;27:479-86.
68. Niederwanger M, Urist MR. Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a substitute for autogeneic bone grafts. *J Oral Implantol* 1996;22:210-5.
69. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:850-5.
70. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics* 2006;38:1424-9.
71. Nishimoto SK, Chang CH, Gendler E, Stryker WF, Nimni ME. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. *Calcif Tissue Int* 1985;37:617-24.

72. Edgar CM, Chakravarthy V, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone* 2007.
73. Callis TE, Cao D, Wang DZ. Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardin transactivation of cardiac genes. *Circ Res* 2005;97:992-1000.
74. White PM, Morrison SJ, Orimoto K, Kubu CJ, Verdi JM, Anderson DJ. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron* 2001;29:57-71.
75. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1367-78.
76. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1:S151-8.
77. 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:2123-34.
78. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine* 2000;25:376-81.
79. Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA. Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 2002;27:2396-408.
80. Vaccaro AR, Anderson DG, Patel T, et al. Comparison of OP-1 Putty (rhBMP-7) to iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: a minimum 2-year follow-up pilot study. *Spine* 2005;30:2709-16.
81. Boden SD. The ABCs of BMPs. *Orthop Nurs* 2005;24:49-52; quiz 3-4.
82. Ruhe PQ, Boerman OC, Russel FG, Mikos AG, Spauwen PH, Jansen JA. In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:919-27.
83. Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol* 2001;28:340-7.
84. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27:S2-8.



85. Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine* 2002;27:S16-23.
86. Uludag H, Gao T, Porter TJ, Friess W, Wozney JM. Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1:S128-35.
87. Colterjohn NR, Bednar DA. Procurement of bone graft from the iliac crest. An operative approach with decreased morbidity. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:756-9.
88. Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 2000;408:998-1000.
89. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *Journal of biomedical materials research* 2001;58:449-55.
90. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8.
91. Cohen SN, Chang AC. A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in *Escherichia coli* by repeated transformation. *Mol Gen Genet* 1974;134:133-41.
92. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:560-4.
93. Blaese RM, Culver KW, Chang L, et al. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Hum Gene Ther* 1993;4:521-7.
94. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998;28:964-73; discussion 73-5.
95. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-72.
96. Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther* 2005;16:1014-5.
97. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8698-703.

98. Cucchiarini M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H. Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* 2007;56:158-67.
99. Cucchiarini M, Madry H, Ma C, et al. Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* 2005;12:229-38.
100. de Vrij J, Uil TG, van den Hengel SK, et al. Adenovirus targeting to HLA-A1/MAGE-A1-positive tumor cells by fusing a single-chain T-cell receptor with minor capsid protein IX. *Gene Ther* 2008.
101. Benjamin R, Helman L, Meyers P, Reaman G. A phase I/II dose escalation and activity study of intravenous injections of OCaP1 for subjects with refractory osteosarcoma metastatic to lung. *Hum Gene Ther* 2001;12:1591-3.
102. Martinek V, Latterman C, Usas A, et al. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:1123-31.
103. Lieberman JR, Ghivizzani SC, Evans CH. Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. *Mol Ther* 2002;6:141-7.
104. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
105. Hannallah D, Peterson B, Lieberman JR, Fu FH, Huard J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 2003;52:753-68.
106. Evans CH, Ghivizzani SC, Herndon JH, Robbins PD. Gene therapy for the treatment of musculoskeletal diseases. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:230-42.
107. Partridge K, Yang X, Clarke NM, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:144-52.
108. Michael Hallek E-LW. Ethische und juristische Aspekte der Gentherapie. Herbert Utz Verlag, München 1999.
109. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, et al. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:355-65.
110. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2004:316-29.
111. Scaduto AA, Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am* 1999;30:625-33.

112. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1103-14.
113. Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, et al. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:402-6.
114. Goldstein SA, Bonadio J. Potential role for direct gene transfer in the enhancement of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S154-62.
115. Fang J, Zhu YY, Smiley E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5753-8.
116. Oligino TJ, Yao Q, Ghivizzani SC, Robbins P. Vector systems for gene transfer to joints. *Clin Orthop Relat Res* 2000:S17-30.
117. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet* 2000;1:91-9.
118. Scully SP. Gene therapy: clinical considerations. *Clin Orthop Relat Res* 2000:S55-8.
119. Gao X, Kim KS, Liu D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J* 2007;9:E92-104.
120. Kawai M, Bessho K, Kaihara S, et al. Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. *Hum Gene Ther* 2003;14:1547-56.
121. Endo M, Kuroda S, Kondo H, Maruoka Y, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by modified gene-activated matrix: Effectiveness in segmental tibial defects in rats. *Tissue Eng* 2006;12:489-97.
122. Stiehler M, Duch M, Mygind T, et al. Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2006;585:31-48.
123. Park J, Ries J, Gelse K, et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 2003;10:1089-98.
124. Liu F, Qi H, Huang L, Liu D. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther* 1997;4:517-23.
125. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000;7:31-4.

126. Dash PR, Read ML, Barrett LB, Wolfert MA, Seymour LW. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* 1999;6:643-50.
127. 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.
128. Vandenberghe LH, Wilson JM. AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* 2007;7:325-33.
129. 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.
130. 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.
131. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1994;1189:195-203.
132. Lechardeur D, Verkman AS, Lukacs GL. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:755-67.
133. Hoekstra D. Membrane fusion of enveloped viruses: especially a matter of proteins. *J Bioenerg Biomembr* 1990;22:121-55.
134. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* 1999;6:482-97.
135. Pante N, Aebi U. Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:397-406.
136. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7413-7.
137. Liu D, Ren T, Gao X. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 2003;10:1307-15.
138. 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 Ther* 2000;7:1183-92.
139. Schillinger U, Wexel G, Hacker C, et al. A fibrin glue composition as carrier for nucleic Acid vectors. *Pharm Res* 2008;25:2946-62.

140. Kullmer M. Lokaler Gentransfer mit implantierbaren Arzneistoffträgern. Neue Wege zur Rekonstruktion von Haut- und Knochengewebe. [http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6429/1/Kullmer\\_Martin.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6429/1/Kullmer_Martin.pdf) 2006.
141. Garnett MC. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999;16:147-207.
142. Blessing T, Remy JS, Behr JP. Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1427-31.
143. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7297-301.
144. Sonawane ND, Szoka FC, Jr., Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem* 2003;278:44826-31.
145. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 2001;3:135-44.
146. 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.
147. Hacker CB, S.; Plank, C.; Stemberger, A. . Fibrin-a new tool for gene delivery. *Annals of Hematology* 2003;82:33.
148. Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 2004;303:1818-22.
149. Breunig M, Bauer S, Goepferich A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm* 2008;68:112-28.
150. Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost* 2003;89:573-82.
151. McPherson JM. The utility of collagen-based vehicles in delivery of growth factors for hard and soft tissue wound repair. *Clin Mater* 1992;9:225-34.
152. Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, Yamane S, Bauer TW, Togawa D. A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute: emphasis of surgical exploration and histologic assessment. *Spine* 2006;31:1067-74.
153. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:329-45.

154. Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S37-43.
155. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001;28:341-50.
156. Albala DM, Lawson JH. Recent clinical and investigational applications of fibrin sealant in selected surgical specialties. *J Am Coll Surg* 2006;202:685-97.
157. Schlag G, Redl H. Fibrin sealant in orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res* 1988;227:269-85.
158. Schexneider KI. Fibrin sealants in surgical or traumatic hemorrhage. *Curr Opin Hematol* 2004;11:323-6.
159. Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty. *Bulletin (Hospital for Joint Diseases (New York, NY* 1997;56:222-4.
160. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plastic and reconstructive surgery* 2001;108:1713-26.
161. Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 2002;23:3023-31.
162. Arbes H, Bosch P, Lintner F, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.). *Arch Orthop Trauma Surg* 1981;98:183-8.
163. Cole M, Cox S, Inman E, et al. Fibrin as a delivery vehicle for active macrophage activator lipoprotein-2 peptide: in vitro studies. *Wound Repair Regen* 2007;15:521-9.
164. Andree C, Voigt M, Wenger A, et al. Plasmid gene delivery to human keratinocytes through a fibrin-mediated transfection system. *Tissue Eng* 2001;7:757-66.
165. Ren WH, Yang LJ, Dong SZ. Induction of reparative dentin formation in dogs with combined recombinant human bone morphogenetic protein 2 and fibrin sealant. *Chin J Dent Res* 1999;2:21-4.
166. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 2003;48:430-41.

167. Schillinger UW, G; Hacker, C; Kullmer, M; Stemberger, A; Plank, C. Copolymer-protected vector mediated BMP-2 gene delivery to articular chondrocytes in a 3-dimensional

injectable fibrin matrix for tissue engineering. *Molecular Therapy* 2004;9; 846 Suppl.:S321-S.

168. Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, et al. Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. *J Orthop Res* 2004;22:376-81.

169. Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, Gratz KW, Schawalder P, Hubbell JA. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 2005;89:253-62.

170. Rai B, Teoh SH, Hutmacher DW, Cao T, Ho KH. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials* 2005;26:3739-48.

171. Xu XL, Lou J, Tang T, et al. Evaluation of different scaffolds for BMP-2 genetic orthopedic tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;75:289-303.

172. Hong SJ, Kim CS, Han DK, et al. The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 2006;27:3810-6.

173. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:164-9.

174. Zhu SJ, Choi BH, Jung JH, et al. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:175-9.

175. Arnander C, Westermarck A, Veltheim R, Docherty-Skog AC, Hilborn J, Engstrand T. Three-Dimensional Technology and Bone Morphogenetic Protein in Frontal Bone Reconstruction. *J Craniofac Surg* 2006;17:275-9.

176. Patel VV, Zhao L, Wong P, et al. Controlling bone morphogenetic protein diffusion and bone morphogenetic protein-stimulated bone growth using fibrin glue. *Spine* 2006;31:1201-6.

177. Patel VV, Zhao L, Wong P, et al. An in vitro and in vivo analysis of fibrin glue use to control bone morphogenetic protein diffusion and bone morphogenetic protein-stimulated bone growth. *Spine J* 2006;6:397-403; discussion 4.

178. Lee TC, Ho JT, Hung KS, Chen WF, Chung YH, Yang YL. Bone morphogenetic protein gene therapy using a fibrin scaffold for a rabbit spinal-fusion experiment. *Neurosurgery* 2006;58:373-80; discussion -80.
179. Smith JD, Melhem ME, Magge KT, Waggoner AS, Campbell PG. Improved growth factor directed vascularization into fibrin constructs through inclusion of additional extracellular molecules. *Microvasc Res* 2007;73:84-94.
180. Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, Lee SY, Lee JH, Tae G. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release* 2007;121:91-9.
181. Kim HJ, Kang SW, Lim HC, et al. The role of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein with fibrin glue in healing of bone-tendon junction injury. *Connect Tissue Res* 2007;48:309-15.
182. Cui G, Li J, Lei W. [Effect of injectable fibrin sealant compounded with bone morphogenetic protein on proliferation and differentiation of marrow stromal cells towards osteoblasts in rabbits]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2007;21:70-5.
183. Schmoekel HG, Weber FE, Hurter K, et al. Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 2005;46:17-21.
184. Han DK, Kim CS, Jung UW, et al. Effect of a fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76:2216-22.
185. Hubbell J. Matrix-bound growth factors in tissue repair. *Swiss Med Wkly* 2006;136:387-91.
186. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12:261-73.
187. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002;30:816-22.
188. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* 2000;7:734-9.
189. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:905-17.



190. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88:701-5.
191. Jeppsson C, Aspenberg P. BMP-2 can inhibit bone healing. Bone-chamber study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1996;67:589-92.
192. Jeppsson C, Bostrom M, Aspenberg P. Intraosseous BMP implants in rabbits. Inhibitory effect on bone formation. *Acta Orthop Scand* 1999;70:77-83.
193. Lutz R, Park J, Felszeghy E, Wiltfang J, Nkenke E, Schlegel KA. Bone regeneration after topical BMP-2-gene delivery in circumferential peri-implant bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:590-9.
194. Baas J, Elmengaard B, Jensen TB, Jakobsen T, Andersen NT, Soballe K. The effect of pretreating morselized allograft bone with rhBMP-2 and/or pamidronate on the fixation of porous Ti and HA-coated implants. *Biomaterials* 2008;29:2915-22.
195. 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;142:3656-62.
196. Toth JM, Boden SD, Burkus JK, Badura JM, Peckham SM, McKay WF. Short-term Osteoclastic Activity Induced by Locally High Concentrations of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Cancellous Bone Environment. *Spine* 2009.
197. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Lubberstedt 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;76:50-5.
198. Kwong FN, Hoyland JA, Evans CH, Freemont AJ. Regional and cellular localisation of BMPs and their inhibitors' expression in human fractures. *Int Orthop* 2009;33:281-8.
199. Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 1996;272:738-41.
200. 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;50:553-64.
201. Kwong FN, Richardson SM, Evans CH. Chordin knockdown enhances the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R65.

202. Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, et al. Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem* 2007;282:26450-9.
203. Wozney JM, Li RH. Engineering what comes naturally. *Nat Biotechnol* 2003;21:506-8.
204. Ye Q, Zund G, Benedikt P, et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17:587-91.
205. Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:551-8.
206. Kim SJ, Jang JD, Lee SK. Treatment of long tubular bone defect of rabbit using autologous cultured osteoblasts mixed with fibrin. *Cytotechnology* 2007;54:115-20.
207. Eyrich D, Brandl F, Appel B, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 2007;28:55-65.
208. Jarzem P, Harvey EJ, Shenker R, Hajipavlou A. The effect of fibrin sealant on spinal fusions using allograft in dogs. *Spine* 1996;21:1307-12.
209. Pinholt EM, Solheim E, Bang G, Sudmann E. Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats: a comparative study of fibrin-collagen paste, fibrin sealant, and polyorthoester with gentamicin. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:1300-4.
210. Turgut M, Erkus M, Tavus N. The effect of fibrin adhesive (Tisseel) on interbody allograft fusion: an experimental study with cats. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141:273-8.
211. Albrektsson T, Bach A, Edshage S, Jonsson A. Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate: a microradiographical evaluation using the bone growth chamber. *Acta Orthop Scand* 1982;53:757-63.
212. Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG, et al. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005;26:3113-21.
213. Huang Q, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng* 2002;8:469-82.
214. Kawamura M, Urist MR. Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1988:302-10.
215. Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999;17:551-4.

216. Vogt S, Ueblacker P, Geis C, et al. Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector. *Biomaterials* 2008;29:1242-9.
217. Gelse K, Jiang QJ, Aigner T, et al. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001;44:1943-53.
218. Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1778-90.
219. Baltzer AW, 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 Sports Traumatol Arthrosc* 1999;7:197-202.
220. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:197-208.
221. Koh JT, Ge C, Zhao M, et al. Use of a stringent dimerizer-regulated gene expression system for controlled BMP2 delivery. *Mol Ther* 2006;14:684-91.
222. 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:1032-44.
223. Diefenderfer DL, Osyczka AM, Garino JP, Leboy PS. Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 3:19-28.
224. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999:S59-67.
225. Wildemann B, Kandziora F, Krummrey G, et al. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release* 2004;95:249-56.
226. Sumner DR, Turner TM, Urban RM. Animal models relevant to cementless joint replacement. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:333-45.
227. Black J. "Push-out" tests. *Journal of biomedical materials research* 1989;23:1243-5.
228. Harrigan TP, Kareh J, Harris WH. The influence of support conditions in the loading fixture on failure mechanisms in the push-out test: a finite element study. *J Orthop Res* 1990;8:678-84.

229. Raab S, Ahmed AM, Provan JW. The quasistatic and fatigue performance of the implant/bone-cement interface. *Journal of biomedical materials research* 1981;15:159-82.
230. Shirazi-Adl A. Finite element stress analysis of a push-out test. Part 1: Fixed interface using stress compatible elements. *J Biomech Eng* 1992;114:111-8.
231. Yuehuei H. An RAD. The validity of a single push-out test. In: *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface* 2000:477–88.
232. Dayer R, Rizzoli R, Kaelin A, Ammann P. Low protein intake is associated with impaired titanium implant osseointegration. *J Bone Miner Res* 2006;21:258-64.
233. Corten FG, Caulier H, van der Waerden JP, Kalk W, Corstens FH, Jansen JA. Assessment of bone surrounding implants in goats: ex vivo measurements by dual X-ray absorptiometry. *Biomaterials* 1997;18:495-501.
234. Dhert WJ, Verheyen CC, Braak LH, et al. A finite element analysis of the push-out test: influence of test conditions. *Journal of biomedical materials research* 1992;26:119-30.
235. Schmidmaier G, Wildemann B, Schwabe P, et al. A new electrochemically graded hydroxyapatite coating for osteosynthetic implants promotes implant osteointegration in a rat model. *Journal of biomedical materials research* 2002;63:168-72.
236. Faensen B, Hain C, Hohne J, et al. Aprotinin application has no negative effect on osseous implant integration: a biomechanical and histomorphometric investigation in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008.
237. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 1987;2:69-75.
238. Julius Wolff (1836-1902). Morphogenesis of bone. *JAMA* 1970;213:2260.
239. Soballe K, Overgaard S, Hansen ES, Brokstedt-Rasmussen H, Lind M, Bunger C. A review of ceramic coatings for implant fixation. *Journal of long-term effects of medical implants* 1999;9:131-51.
240. Jerosch J, Muchow H, Clahsen H. [Stability of human bone cortex following various preservation and sterilization methods]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1991;129:295-301.
241. Nicholls PJ, Berg E, Bliven FE, Jr., Kling JM. X-ray diagnosis of healing fractures in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1979:234-6.

242. Panjabi MM, Lindsey RW, Walter SD, White AA, 3rd. The clinician's ability to evaluate the strength of healing fractures from plain radiographs. *J Orthop Trauma* 1989;3:29-32.
243. Pecina M, Vukicevic S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. *Int Orthop* 2007;31:719-20.
244. Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 2002;277:30177-82.
245. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;38 Suppl 4:S3-6.
246. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S5-8.

## 10 Danksagung

Die Experimente und Auswertung der vorliegenden Arbeit wurden zwischen 2005 und 2006 am Forschungslabor des Julius Wolff Institut der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die schriftliche Anfertigung geschah 2008 im Rahmen eines Promotionssemester.

Mein Dank gilt daher zunächst Herrn Univ.- Prof. Dr. med. N. P. Haas und Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg. N. Duda für die Möglichkeit die Experimente durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Britt Wildemann und Herrn PD Dr. med. Gerhard Schmidmaier für die freundliche Überlassung des Themas. Ausdrücklich möchte ich mich für die stets hervorragende, intensive, motivierende und fachkundige wissenschaftliche Betreuung von Frau Wildemann bedanken.

Mein Dank gilt ferner den verschiedenen Kollegen, die an Teilen der Arbeit mitgewirkt haben, besonders meinem Promotionsbetreuer Dr. med. Benjamin Faensen, meinen Promotionskollegen Yvonne Funk und Christian Hain, und den Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung und sowie des histologischen Labors des Campus Virchow Klinikums der Charité für die kollegiale Durchführung und Auswertungen der Tierexperimente. Herrn Dipl.-Ing. Jan-Erik Hoffmann danke ich für die Unterstützung im Biomechaniklabor.

Erst durch die Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurde der vorliegende Versuch ermöglicht (SCHM 1436/5-1), dafür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Für die mir gewährte studentische Forschungsförderung der Charité – Universitätsmedizin Berlin möchte ich mich herzlich bedanken. Genauso danke ich meinen Eltern Jutta Höhne und Wolfgang Cojaniz sowie meinem Onkel Lutz Höhne für die finanzielle Unterstützung.

Für die liebe und unermüdliche Unterstützung bedanke ich mich bei meiner Freundin Christina Strack.

Mein Dank und meine größte Anerkennung gelten meiner Familie, ohne deren materielle und ideelle Unterstützung und ihr anhaltendes Vertrauen meine Universitätsausbildung und diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für diesen Rückhalt bin ich unendlich dankbar.

Julius Höhne

## **11 Anhang**

### **11.1 Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 21.04.2009

Julius Höhne



## **11.2 Curriculum vitae**

### **Julius Höhne**

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

### 11.3 Publikationsverzeichnis

Faensen, B; Wildemann, B; Hain, C; **Höhne, J**, et al. Impaired implant fixation under the influence of locally applied BMP-2 specific plasmids, Poster Bone Biology Congress Berlin 2008, Orthopedic Research Society Annual Meeting Las Vegas 2009

Faensen, B, Wildemann, B, Schwabe, P, Stemberger, A, Plank, C, Funke, Y, Hain, C, **Höhne, J**, Schmidmaier, G. Applikation von BMP-2 spezifischem Plasmid in Fibrinkleber fördert nicht die Implantateinheilung, Poster 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie 2008

Faensen B, Hain C, **Höhne J**, et al. Aprotinin application has no negative effect on osseous implant integration: a biomechanical and histomorphometric investigation in a rat model. Arch Orthop Trauma Surg 2009;129:51-6