

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden mittels non-viralen
Vektors zur Stimulation der Frakturheilung
– Eine biomechanische Untersuchung am Rattenmodell –

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Reinwart, geb. Eberhart

aus Bernau bei Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

Meinen Eltern, Bruder

&

Tino

Vorwort

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

Beitrag im Einzelnen: Anteil an der Methodik der Zellkulturen und deren Ergebnisse, Anteil an anästhesiologischer/ operativer, radiologischer und biomechanischer Methodik, Nachsorgeuntersuchungen, Erarbeitung der biomechanischen und anteilig der radiologischen Ergebnisse.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Abbildungsverzeichnis	7
2 Tabellenverzeichnis	9
3 Abkürzungsverzeichnis	10
4 Zusammenfassung/Abstract	13
5 Einleitung	16
5.1 Klinische Situation der Frakturheilung	16
5.2 Die physiologische Frakturheilung	16
5.3 Pseudarthrosebildung	18
5.4 Ansätze zur Optimierung der Frakturheilung	19
5.5 Wachstumsfaktoren in der Frakturheilung	20
5.5.1 Bone-Morphogenetic Protein	21
5.5.2 Der BMP-2-Signalweg	22
5.5.3 Klinische Anwendung von BMPs	23
5.6 Gentherapie als Ansatz der Therapie bei Frakturen	23
5.6.1 Formen der Gentherapie	23
5.6.2 Die Sicherheit der somatischen Gentherapie	25
5.6.3 Vektoren in der Gentherapie	25
5.6.4 Copolymer-protected Gene-Vectors (COPROGs)	28
5.6.5 Poly-(D,L-Laktid) PDLLA	29
5.7 Ziele und Arbeitshypothesen	29
6 Material und Methoden	31
6.1 Titanimplantate, Beschichtung und Plasmide	31
6.2 Zellkulturen	32
6.3 Versuchstiere	33
6.3.1 Gruppeneinteilung und Versuchsplan	33
6.3.2 Frakturmodell und Frakturmaschine	34
6.4 Anästhesie und operatives Vorgehen	35
6.4.1 Verwendete Materialien	35
6.4.1.1 Anästhesie	35
6.4.1.2 Operation	36

6.4.1.3	Eingangs- und Nachuntersuchungen	36
6.4.2	Durchführung Anästhesie	37
6.4.3	Durchführung Operation	37
6.4.4	Eingangs- und Verlaufsuntersuchungen	38
6.4.4.1	Verwendete Materialien.....	38
6.4.4.2	Durchführung.....	39
6.5	Nachsorge	40
6.6	Tötung, Knochen- und Gewebeentnahme.....	40
6.6.1	Materialien	40
6.6.2	Durchführung	40
6.7	Biomechanische Testung	41
6.7.1	Materialien	41
6.7.2	Durchführung	41
6.7.2.1	Einbettung	41
6.7.2.2	Die Torsionsmaschine.....	42
6.7.2.3	Die Torsionsmessung.....	43
6.7.2.4	Auswertung der Daten.....	44
6.8	Die histomorphologische Untersuchung (Nicht Teil dieser Promotion).....	45
6.9	Die Untersuchung auf systemische Tranfektion (Nicht Teil dieser Promotion) .	45
6.10	Radiologische Auswertung	46
6.11	Statistik.....	46
7	Ergebnisse	47
7.1	In-vitro-Versuch – Zellkultur.....	47
7.1.1	Luciferase-Zellkultur.....	47
7.1.2	BMP-2-Zellkultur	47
7.2	In-vivo-Tierversuch	48
7.2.1	Allgemeine Untersuchungsergebnisse.....	48
7.2.2	Blutuntersuchungen, Gewicht und Temperatur.....	49
7.2.3	Röntgenauswertung der Tiere	50
7.2.4	Biomechanische Auswertung.....	52
7.2.4.1	Maximales Drehmoment nach 28 Tagen Standzeit.....	52
7.2.4.2	Torsionale Steifigkeit nach 28 Tagen Standzeit	53

7.2.4.3	Maximales Drehmoment nach 42 Tagen Standzeit	54
7.2.4.4	Torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen	54
7.2.5	Histomorphometrische Auswertung (Nicht Teil dieser Promotion)	55
7.2.6	Auswertung der Luciferase-Expression (Nicht Teil dieser Promotion)	56
8	Diskussion.....	58
8.1	Diskussion der biomechanischen Ergebnisse	58
8.2	Diskussion des Vektors	60
8.3	Diskussion der Dosierung.....	61
8.4	Diskussion der Beschichtung	62
8.5	Diskussion des Tiermodells.....	63
8.6	Diskussion des Frakturmodells.....	64
8.7	Ausblick.....	65
8.8	Zusammenfassung	66
9	Literaturverzeichnis	68
10	Eidesstattliche Versicherung.....	91
11	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	92
12	Lebenslauf	93
13	Publikationen	94
14	Danksagung.....	95

1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung: a) Entzündungsphase, b) Phase des weichen Kallus, c) Phase des harten Kallus, d) Phase des Remodeling.	18
Abb.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade von Wachstumsfaktoren.....	20
Abb.3: Schematische Darstellung des BMP-2-Signalweges	22
Abb.4: Schematische Darstellung der Gentherapieformen.....	24
Abb.5: Überblick über die verschiedenen Vektorarten, welche in klinischer Erforschung sind (modifiziert nach Ginn et al. 2013)	26
Abb.6: Schematische Darstellung der Zusammenfügung der COPROGs	28
Abb.7: Vektorkarte BMP-2 Plasmid.....	32
Abb.8: Schematische Darstellung der Frakturmaschine, 1. Schlaggewicht; 2. Führungsstange; 3. Schlagwerkzeug; 4. Stützboss; 5. Fixierungsplatte.....	35
Abb.9: Einzelne Operationsschritte, a: Hautinzision, b: Markraumeröffnung, c: Fraktursetzung, d: Osteosynthese.....	38
Abb.10: a) Haltevorrichtung, b) Haltevorrichtung mit eingebetteter Tibia und Visierhilfe c) vollständig eingebettete Tibia	42
Abb.11: Torsionsmaschine zur biomechanischen Testung der eingebetteten Tibiae (Bezeichnung der Bestandteile im Haupttext von Kapitel 3.7.2.2)	43
Abb.12: Testkurve einer Rattentibia mit Darstellung Torsionsmoment (Nmm) zur Winkeländerung (°).....	44
Abb.13: In-vitro-Expression von COPROGs+Luciferase im Vergleich zu nackter Luciferase-DNA	47
Abb.14: In-vitro-Expression von COPROGs+BMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (COPROGs ohne DNA).....	48
Abb.15: Röntgenbilder nach 42 Tagen Standzeit der verschiedenen Gruppen.....	51
Abb.16: Beispielbilder für die Ermittlung des Röntgenscores	51
Abb.17: Röntgenscore nach 28 Tagen Standzeit (A=0 Überbrückungen, B=1-3 Überbrückungen, C=4 Überbrückungen).....	52

Abb.18: Röntgenscore nach 42 Tagen Standzeit (A=0 Überbrückungen, B=1-3 Überbrückungen, C=4 Überbrückungen).....	52
Abb.19: Gegenüberstellung des maximalen Drehmoments zwischen den einzelnen Gruppen nach 28 Tagen.....	53
Abb.20: Vergleich der torsionalen Steifigkeit zwischen den Gruppen nach 28 Tagen..	53
Abb.21: Mittlere Werte des maximalen Drehmoments nach 42 Tagen; *p> 0,005 (ANOVA, Bonferroni).....	54
Abb.22: Mittlere Werte für die torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen.....	55
Abb.23: Histologie der Kallusregion nach 42 Tagen in van-Kossa-Färbung.....	56
Abb.24: Semiquantitative PCR-Ergebnisse der Transfektion von Luciferase in den einzelnen Knochenproben.....	57

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Versuchsplan.....	34
Tab. 2: Durchschnittliches Gewicht der Tiere und Körpertemperaturen	50
Tab. 3: Histomorphometrische Analyse der Kallusregion der Tibia nach 28 Tagen	56
Tab. 4: Histomorphometrische Analyse der Kallusregion der Tibia nach 42 Tagen.....	57

3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
BESTT	the BMP-2-Evaluation in Surgery for tibial Trauma
BMP	Bone-Morphogenetic Protein
BMP-2	Bone-Morphogenetic Protein-2
BMP-7	Bone-Morphogenetic Protein-7
BMPRIa	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Ia
BMPRIb	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor Ib
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic-Acid
cm	Zentimeter
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
COPROGs	Copolymer-protected Gene-Vectors
CRP	c-reaktives Protein
DBM	demineralisierte Bone-Matrix
DFG	deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles-Medium
DNA	Deoxyribonucleic-Acid
Dr.	Doktor
ELISA	Enzymed-liked Immunosorbent-Assay
ERK 1/2	Extrazelluläre-Rezeptor-Kinase 1 und 2
F	physikalische Einheit für Kraft
Fa.	Firma
FBS	Fetale Bovine-Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FGF-2	Fibroblast-Growth-Factor-2
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GAPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde

hBMP	humanes Bone-Morphogenetic Protein
IGF	Insulin-like Growth-Factor
Intl.	International
i. S.	im Sinne
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KV	Kilovolt
K-Drahte	Kirschner-Drahte
mAs	Milliamperesekunde
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular/Cellular Hemoglobin-Concentration
MSC	Mesenchymale Stammzellen
mg	Milligramm
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Korperschaft
min	Minute
mm	Millimeter
ml	Milliliter
ml/min	Milliliter pro Minute
MPV	Mean Plateled Volume
N	Newton
NF-kB	nuclear factor-`kappa-light-chain-enhancer` of activated B-Cells
Nmm	Newtonmillimeter
Nr.	Nummer
No.	engl. Nummer
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	Plateled-derives Growth-Factor
PDGF-BB	Untereinheit des Plateled-derives Growth-Factor
PDLLA	Poly-D,L-Lactid-Acid
PEG	Poly-Ethylenglycol
PEI	Polyethylenimine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin
Prof.	Professor
PTH	Parathormon
rhBMP	rekombinantes humanes Bone-Morphogenetic Protein
rhBMP-2	rekombinantes humanes Bone-Morphogenetic Protein-2

RIA	Reamer-Irrigator-Aspirator
RLU	Relative Light-Units
RLU/ μ g	Relative Light-Units pro Mikrogramm
RNA	Ribonucleic-Acid
ROI	Regio of Interest
sog.	Sogenannte
TAK1/TAB1	Transforming Growth Factor- β -aktivierte Kinase 1 und Bindungsprotein 1
TGF- β	Transforming Growth-Factor-Beta
U/min	Unit pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

4 Zusammenfassung/Abstract

Frakturen stellen eine relevante Belastung für die betroffenen Patienten dar, haben aber durch Arbeitsausfälle, Pflege- und Rehabilitationsmaßnahmen auch eine Bedeutung für die Gesundheitssysteme. Zur Verbesserung der Frakturheilung konzentrieren sich viele Studien auf die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie dem Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). Einen Ansatz stellt dabei die Gentherapie dar und hier speziell die lokale Applikation einer Wachstumsfaktoren-kodierenden DNA mittels non-viraler Vektoren, den sogenannten Copolymer-Protected Gene Vectors (COPROGs).

Ziel der Studie war es, die Frakturheilung unter dem Einfluss lokaler Applikation von BMP-2 Plasmiden in einem Rattenmodell zu untersuchen.

Grundlage der Versuche war die Einarbeitung und konsekutive Freisetzung der untersuchten Substanzen aus einer biodegradierbaren Poly-(D,L-Laktid-) (PDLLA) Implantatbeschichtung. Zunächst erfolgte hierzu eine in-vitro Versuchsreihe, wobei Rattenosteoblasten mit COPROGs+BMP-2 Plasmid oder COPROGs+Luciferase-Plasmid transfiziert und die jeweilige Expression gemessen wurde. In-vivo wurden dann in einem etablierten Rattenfrakturmodell standardisierte Tibiafrakturen gesetzt und diese entweder mit Kirschner-Drähten ohne Beschichtung (n = 10) oder einer PDLLA-Beschichtung mit BMP-2 Plasmid (n = 10) oder einem Luciferase-Plasmid (n = 10) operativ stabilisiert. Nach einer Standzeit von 28 und 42 Tagen wurde jeweils die biomechanische Auswertung des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit der frakturierten Tibiae im Vergleich zur gesunden Gegenseite durchgeführt. Zudem erfolgte in anderen Promotionsarbeiten eine histomorphometrische Auswertung und die Analyse einer systemischen Transfektion durch das Luciferase-Plasmid.

In den in-vitro Experimenten konnte eine BMP-2 Expression vom 2. bis 10. Tag gemessen werden, während die Luciferase bis zum 21. Tag nachgewiesen wurde. In den in-vivo Versuchen konnte nach 28 Tagen das höchste maximale Drehmoment in der Gruppe mit COPROGs+BMP-2 Plasmid bestimmt werden, während bei der torsionalen Steifigkeit die höchsten Messwerte in der Gruppe der COPROGs ohne Plasmid lagen, ohne das eine Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Nach 42 Tagen konnten sowohl die höchsten Werte beim maximalen Drehmoment, als auch bei der torsionalen Steifigkeit in der Gruppe mit COPROGS+BMP-2 Plasmid gemessen werden. Eine signifikante Erhöhung bestand hier beim maximalen Drehmoment in der COPROGS + BMP-2 Plasmid Gruppe gegenüber der unbeschichteten Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten die Tendenz, aber nicht den eindeutigen Nachweis einer positiven Wirkung der lokalen Applikation von COPROGS+BMP-2 Plasmiden bei der Frakturheilung an Rattentibiae. Während die histomorphologische Untersuchung der Frakturzonen in anderen Dissertationsarbeiten keine richtungsweisenden Ergebnisse erbrachte, konnte aber eine systemische Transfektion ausgeschlossen werden. Die Wirkung von Wachstumsfaktoren und auch die Bedeutung von gentechnischen lokalen Therapiemechanismen erscheinen auch im Vergleich zu der bestehenden Literatur sehr multifaktoriell bedingt und sollten in weiteren Studien erforscht werden.

Abstract

Fractures constitute a relevant burden for affected patients, but due to work losses, care- and rehabilitation measures they also have an impact on the health system. To improve fracture healing many studies focus on the impacts of growth factors like the Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). One approach is the gene therapy, here particularly the local application of growth-factor-encoding DNA through non-viral vectors, so called Copolymer-Protected Gene Vectors (COPROGs).

The study's aim was to learn about the fracture healing under the influence of local application of BMP-2 plasmids in a rat-model.

The trials basis was to bring in and consecutive set free the examined substances out of a biodegradable Poly-(D,L-Lactide-) (PDLLA) implant coating. First an in-vitro test series was done, in which rat-osteoblasts were transfected with COPROGs+BMP-2 plasmid or COPROGs+luciferase-plasmid and each of their expression was measured. In-vitro standardized tibia fractures were set in an established rat-fracture-model and surgically stabilized either with Kirschner-wires without coating (n = 10), a PDLLA-coating with BMP-2 plasmid (n = 10) or a Luciferase-plasmid (n = 10). Following a lifetime of 28 and 42 days, biomechanical evaluations were done concerning maximum torque and torsional stiffness of the fractured tibias compared to their healthy opposing parts. An additional histomorphometric evaluation and the analysis of a systemic transfection through the Luciferase-plasmid were produced in other promotional works.

Within the in-vitro experiments a BMP-2 expression was measured from day 2 to day 10, while the Luciferase was proven until day 21. In the in-vitro tests the highest maximal torque was determined after 28 days in the COPROGs+BMP-2 plasmid group, while torsional stiffness measured the highest in the COPROG-group without plasmid – without

any proven significance. After 42 days the highest values in maximum torque as well as in torsional stiffness were measured in the group with COPROGS+BMP-2 plasmides. A significant increase was seen in maximum torque in the COPROGS + BMP-2 plasmid group compared to the uncoated controlgroup ($p < 0,05$).

The results of this study indicate the tendency, although not the clear proof, of a positive effect of local application of COPROGS+BMP-2 plasmides in terms of fracture-healing in rat-tibias. While the histomorphologic examination of fracture-zones within other dissertation-work brought no groundbreaking results, they excluded a systemic transfection. The effect of growth factors and also the meaning of genetically local therapy mechanisms appear, even compared to existing literature, highly multifactorial conditioned and therefore should be researched in further studies.

5 Einleitung

5.1 Klinische Situation der Frakturheilung

Erkrankungen des Halte- und Bewegungsapparates gehören international zu den häufigsten Ursachen für chronische Schmerzen und körperliche Behinderungen. Mehrere hundert Millionen Menschen leiden unter muskuloskeletalen Pathologien oder deren Folgen – mit konsekutiv hohen Kosten für die Gesundheitssysteme weltweit (1). Aus diesem Grund wurde zu Beginn des neuen Jahrtausends von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) das erste Jahrzehnt als „Bone und Joint Decade“ ausgerufen. Ziel war es, die Relevanz der Verletzungen und Erkrankungen des Halte- und Bewegungsapparates für die Gesundheits- und Sozialsysteme weltweit zu verdeutlichen (2). Verschiedene Untersuchungen unterstützten diese Bedeutung, wie Daten aus Deutschland zeigten, dass 31 % der Frauen und 45 % der Männer im Alter zwischen 25 und 74 Jahren eine Fraktur erlitten (3). Daten aus den USA ergaben, dass es von 7,8 Millionen Frakturen pro Jahr bei 5–10 % zu einer verzögerten Frakturheilung kam (4), von denen wiederum ca. 10 % einer operativen Therapie bedurften (5). Solche Verläufe bedeuten in erster Linie eine Belastung für die Patienten, aber aus sozioökonomischer Sicht auch für das Gesundheitssystem (4). Störungen der Frakturheilung können dabei biologischer, mechanischer oder traumatischer Genese sein, wobei meist die Kombination verschiedener Einflüsse vorliegt (6). Kommt es zu keiner Heilung nach 4–6 Monaten, wird von einer verzögerten Frakturheilung oder „delayed union“ gesprochen, nach 6–8 Monaten von einer Pseudarthrose bzw. „non-union“ (5). Die Frakturheilung oder die Entwicklung von Pseudarthrosen werden von vielfältigen Risikofaktoren beeinflusst (z. B. Diabetes mellitus, Rauchen, Alkoholabusus, Lebensalter, Medikamente) (7) sowie auch der Schwere des Traumas und des Ausmaßes der lokalen Verletzungsfolgen (7).

5.2 Die physiologische Frakturheilung

Eine Fraktur wird als Kontinuitätsunterbrechung des Knochens durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung, unter Bildung von Fragmenten, definiert (8). Die Frakturheilung ist dabei ein komplexer biologischer Prozess, an dem viele verschiedene Faktoren beteiligt sind (9). Im Gegensatz zu anderen Geweben resultiert die Frakturheilung nicht in der Bildung einer Narbe, sondern in der kompletten

Rekonstruktion der Struktur und Funktion des Knochengewebes (10). Man unterscheidet die primäre Frakturheilung von der sekundären Frakturheilung.

Die **primäre oder auch direkte Frakturheilung** ist dann möglich, wenn ein direkter Kontakt der Frakturflächen besteht. Grundlage ist dabei die desmale Ossifikation, bei der sich osteoblastäre Zellen aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren. Diese bilden dann das Osteoid als Knochenvorstufe, welches daraufhin – ohne eine knorpelige Vorstufe – zu Knochen mineralisiert (11).

Die **sekundäre oder indirekte Frakturheilung** beinhaltet in vier Stadien sowohl die desmale, als auch eine chondrale Ossifikation (11), bei welcher der Knochenneubildung eine Knorpelbildung vorausgeht:

1. **Hämatombildung und akute Entzündungsphase:** Unmittelbar nach dem Trauma entsteht zunächst ein Frakturhämatom (12), das mit einem hypoxischen Milieu als Gerüst für inflammatorische Zellen dient (13). Diese akute Entzündungsphase hat ihren Höhepunkt nach ca. 24 h (13). Wachstumsfaktoren sorgen für die Rekrutierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Angioblasten, Chondroblasten, Fibroblasten, Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten oder Osteoblasten (9, 14).
2. **Phase des weichen Kallus:** Neben der Resorption nekrotischen Knochengewebes durch Osteoklasten (15), begleitet von einer kontinuierlichen Neoangiogenese (16), kommt es zur Bildung von Osteoid und Kollagenfasern (17). Nach einer Chondrozytendifferenzierung aus den mesenchymalen Stammzellen folgt die Knorpelbildung im hypoxischen Frakturareal (18) unter Einfluss von Wachstumsfaktoren der Transforming-Growth-Factor- β -(TGF- β -)Superfamilie (19).
3. **Phase des harten Kallus:** Der knorpelige Kallus wird resorbiert und in einen harten Kallus umgewandelt. Nach dem Prinzip der desmalen Ossifikation, entsteht dabei zunächst ein unreifer Geflechtknochen (19, 20). Zusätzlich präzipitieren calciumhaltige Granulate im hypoxischen Frakturmilieu mit Phosphaten (9), wodurch die Mineralisation und Knochenformation unterstützt wird (11).
4. **Remodeling:** In einer zweiten resorptiven Phase wird der harte Kallus in einen lamellären Knochen umgewandelt (21). Der Remodeling-Prozess beruht auf einer Balance zwischen Resorption des harten Kallus durch Osteoklasten und Entstehung des lamellären Knochens durch Osteoblasten (19) mit dem Ziel, mechanische Stärke und Stabilität wiederherzustellen (22). Der gesamte Remodeling-Prozess kann dabei jedoch Jahre andauern (17).

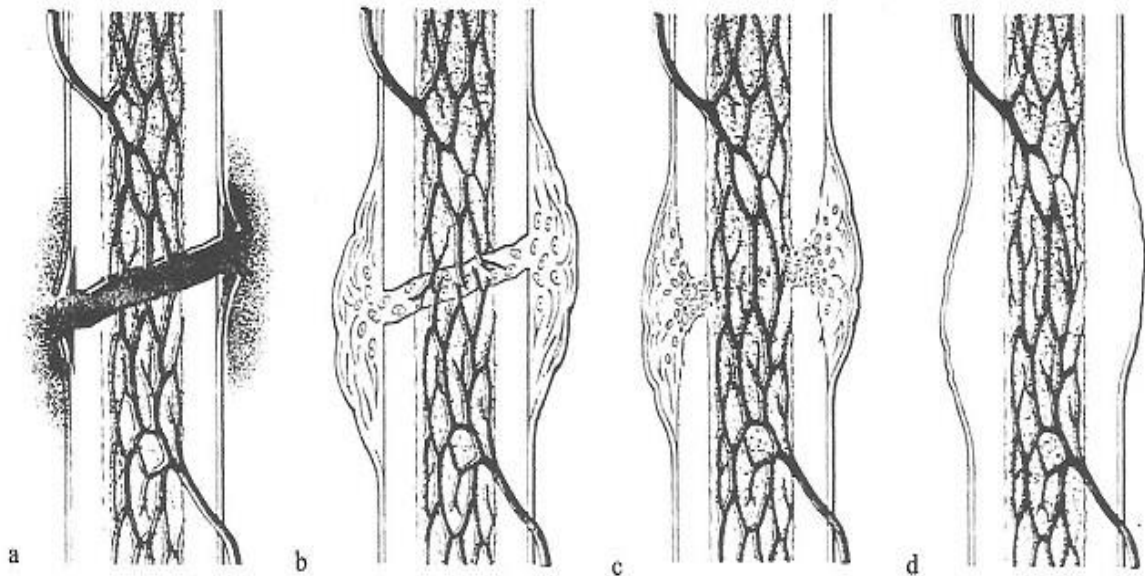


Abb. 1: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung: a) Entzündungsphase, b) Phase des weichen Kallus, c) Phase des harten Kallus, d) Phase des Remodeling (23)

5.3 Pseudarthrosebildung

Pseudarthrosen können in **aseptische und septische Befunde** eingeteilt werden. Für aseptische Pseudarthrosen existieren verschiedene Klassifikationen, wobei letztlich die meisten auf die Prinzipien nach Weber und Cech von 1976 zurückgeführt (24) und nach vital und avital (mit Unterklassifikationen) unterschieden werden können:

Aseptische „vitale“ Pseudarthrosen lassen sich untergliedern in Typ A (hypertroph, übermäßige Kallusbildung), Typ B (mäßig hypertroph, wenig Kallusgewebe) oder Typ C (oligotroph, ohne Kallusbildung). Diese Formen sind biologisch aktiv mit einer vermehrten Durchblutung und Osteogenesepotential (25). Ursächlich ist eine Hypermobilität der Frakturregion, sodass die Therapie in der Stabilitätserhöhung liegt, z. B. einer adäquaten osteosynthetischen Versorgung (26).

Aseptische „avitale“ Pseudarthrosen lassen sich einteilen in Typ A (dystrophe Keilpseudarthrose mit partieller Nekrose), Typ B (Trümmerzonenpseudarthrose mit totaler Nekrose), Typ C (Defektpseudarthrose) und Typ D (atrophe Pseudarthrose). Solche Pseudarthrosen sind durch eine schlechte Durchblutung mit atrophen, inerten und biologisch inaktiven Knochenfragmenten ohne Kallusgewebe oder radiologische Konsolidierungszeichen gekennzeichnet (27). Als Therapie reicht hier eine alleinige Stabilisierung der Frakturzone nicht aus. Es bedarf hier zunächst eines großzügigen

Debridements nekrotischen Gewebes (27) und oft einer zusätzlichen biologischen Stimulation, z. B. durch Dekortikationen oder Knochentransplantationen (26, 28-30).

Bei Pseudarthrosen aufgrund einer Infektion im Bereich der Fraktur spricht man von einer **Infektpseudarthrose oder septischen Pseudarthrose**, die mit einer Inzidenz von bis zu 18 % beschrieben (31) und mit vielen Komplikationen assoziiert sind (32). Das therapeutische Ziel ist hier die Infektsanierung durch ein radikales Debridement in Kombination mit einer Langzeitantibiose und rekonstruktiven Verfahren (z. B. Kallusdistraktion oder Lappenplastiken) (33-35).

5.4 Ansätze zur Optimierung der Frakturheilung

Im Falle einer gestörten oder verzögerten Frakturheilung können unterschiedliche Therapieansätze allein oder in Kombination zur Anwendung kommen.

Die **autologe Spongiosaplastik** wird oft als „Goldstandard“ angesehen (36, 37), da sie viele der für die Knochenheilung erforderlichen Eigenschaften vereint, wie Osteoinduktion (durch autologe zelluläre Bestandteile), Osteogenese (durch Osteoprogenitor Zellen) und Osteokonduktion (Bereitstellung eines Gerüsts durch Knochen trabekel) (38). Neben der direkten Knochenentnahme (z.B. als Beckenkammspan) kann autologe Spongiosa auch mit der Reamer-Irrigator-Aspirator-(RIA-)Methode gewonnen werden (39), wobei auch dies meist eine zusätzliche Eingriffslokalisation und höhere Kosten bedeutet (40-42).

Eine weitere Möglichkeit der ossären Defektfüllung sind **allogene Knochen- transplantate**, z. B. als Demineralisierte Bone-Matrix (DBM) – Spongiosachips, die meist von humanen Leichen stammen und damit dem Problem der Entnahmemorbidität und Materialmenge entgehen (43). Allerdings sind ihre osteoinduktiven Eigenschaften durch Bestrahlung oder Gefriertrocknung herabgesetzt (44), bei möglicher Abstoßungsreaktion oder Infektionsübertragung (44, 45). Alternativ können **osteokonduktive synthetische oder natürliche Biomaterialien** verwendet werden, die das Einwachsen von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen – quasi als Leitschiene – erleichtern sollen (46).

Biophysikalische Methoden zur Unterstützung der Frakturheilung, wie der niedrig-intensiv gepulste Ultraschall (47, 48), elektromagnetische Felder (49) oder die extrakorporale Stoßwellentherapie (50), entbehren – trotz teils guter Konzepte für die

Erklärung der Wirksamkeit auf zellulärer Ebene (4) – zumeist Wirksamkeitsnachweise durch prospektiv randomisierte Studien (49, 51, 52).

Geht die gestörte Frakturheilung mit einem segmentalen Knochenverlust einher, steht z. B. die Distractions-Fixation zur Verfügung, bei welcher der zuvor angefrischte Knochendefekt durch eine äußere Fixiereinrichtung stabilisiert wird (53, 54). Im Verlauf wird diese regelmäßig verstellt, um eine kontrollierte Distraction zu erreichen (55), wobei sich zwischen den Segmenten durch die sog. Distractionsosteogenese neuer Knochen bildet (56). Eine Alternative stellt das 2-stufige Masquelet-Verfahren (57) mit einem zunächst radikalen Debridement von sequestrierten Knochenanteilen und einer Knochenzement-Auffüllung des Defekts dar. Im Intervall (nach ca. 6 Wochen) wird der Zement unter Belassung einer bioaktiven Membran entfernt und die Defekthöhle mit autologem Knochenmaterial aufgefüllt (58).

Des Weiteren sind verschiedene Wachstumsfaktoren in der präklinischen und klinischen Anwendung, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll (59, 60).

5.5 Wachstumsfaktoren in der Frakturheilung

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die als Signalstoffe von Zellen sezerniert werden, um an Zielzellen eine bestimmte Aktion hervorzurufen (61). Der Wachstumsfaktor bindet bei der Zielzelle an die Rezeptoren (die sog. Ligand-Rezeptor-Interaktion), welche neben extrazellulären Bindungskomponenten auch über intrazelluläre Komponenten verfügen, die hier eine Transduktionskaskade induzieren (61). Intrazelluläre Proteine und Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, wandern zum Zellkern, binden an die DNA (*Deoxyribonucleid acid*) und bewirken eine neue Gen-Expression (61) (Abb. 2).

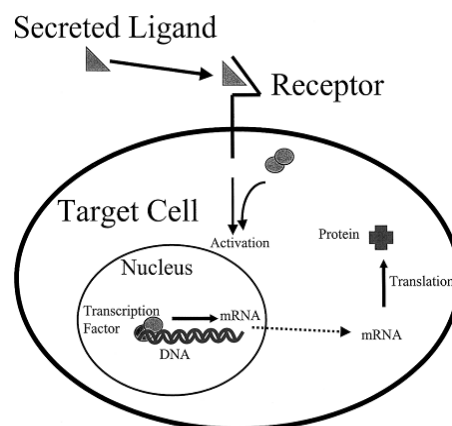


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade von Wachstumsfaktoren (61)

Mit zunehmendem Verständnis der Frakturheilung konnten eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, welche diesen komplexen physiologischen Vorgang regulieren (43). Diese wachstumsfördernden Substanzen sind vor allem an den Frakturrenden identifiziert worden (5) und bewirken während des Reparaturprozesses neben der Zellmigration und Angiogenese die Differenzierung der einzelnen Zelltypen zu Osteoblasten, Osteozyten oder Chondrozyten (5). Bei der Frakturheilung spielen Wachstumsfaktoren eine große Rolle, deren Expression im Verlauf mit einer ossären Konsolidierung korreliert (62). Sie werden von verschiedenen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert und sezerniert. Zu den am meisten untersuchten Wachstumsfaktoren gehören u. a. die TGF- β - Superfamilie (hier v. a. das *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2)), *insulin-like growth factors* (IGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *fibroblast growth factors* (FGF).

5.5.1 Bone-Morphogenetic Protein

Dr. Marshall Urist beschrieb erstmalig 1965 Faktoren, welche osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Im sog. „Knochen-Induktions-Prinzip“ wies er nach, dass die Implantation demineralisierter Knochenmatrix in ein extra-skeletales Gewebe eine Knochenneubildung induzieren kann (63). Die Arbeitsgruppe konnte ein verantwortliches Protein für diese ektope Knochenbildung identifizieren und nannten es „*bone morphogenetic protein*“ (BMP) (63). 1988 konnte die genetische Sequenz der BMPs entschlüsselt und diese rekombinant hergestellt werden (64). Als Teile der TGF- β -Superfamilie wurden über 20 verschiedene BMPs identifiziert (65, 66). Störungen innerhalb der BMP-Regulation können zu Erkrankungen führen, wie Knochenverformungen (*fibrodysplasia ossificans progressiva*), Autoimmunerkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder auch Tumoren (67). BMPs spielen eine wichtige Rolle am Anfang der Frakturheilung und beim Gefäßremodeling (21, 68, 69). Sie nehmen Einfluss auf endotheliale, mesenchymale und knochenspezifische Zellen und besitzen eine osteoinduktive Wirkung (70-78). Zudem konnte gezeigt werden, dass die lokale Applikation von BMPs mittels Trägersubstanzen die Frakturheilung beschleunigen kann (79-83).

5.5.2 Der BMP-2-Signalweg

BMPs werden durch verschiedene signalgebende Zellen ausgeschüttet und erreichen dann durch Diffusion die benachbarten Zellen. Speziell für BMP-2 wurde bisher folgender Signalweg erarbeitet. An der Zielzelle angekommen bindet BMP-2 an verschiedene Membranrezeptoren (84). Entweder sie binden an den BMP Rezeptor Typ Ia oder Ib (85, 86). Während der Rezeptor BMPRIa auf nahezu allen Zelloberflächen vorkommt, ist der Rezeptor BMPRIb seltener anzufinden (87).

Binden sie an die BMPRs, aktivieren sie entweder den Smad-Signalweg oder den Non-Smad-Signalweg. Smads sind intrazelluläre Proteine, welche extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleiten um die Transkription von bestimmten Genen zu aktivieren (85). Der Smad-Signalweg wird aktiviert, wenn BMPRIa und BMPRIb nachgeschaltete Proteine, namens Smad 1/5/8, phosphorylieren (88). Diese wiederum binden Smad4 und dieser Komplex wandert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor für bestimmte Gene (89, 90).

Im Non-Smad-Signalweg werden verschiedene andere Proteinkomplexe, u. a. ERK 1/2 (Extrazelluläre-Rezeptor-Kinase 1 und 2), PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) oder TAB1/TAK1 (Transforming-growth-factor- β -aktivierte-Kinase 1 und Bindungsprotein 1) aktiviert (84). Jeder dieser Signalwege führt zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und Osteoblasten-Vorläuferzellen zu Osteoblasten (84). Ausgenommen davon ist der TAB1/TAK1, welcher NF- κ B und p38 aktiviert. Nf- κ B hat dabei im osteoporotischen Mausmodell eine Inhibierung der Osteoblastenfunktion gezeigt (91, 92) (Abb. 3).

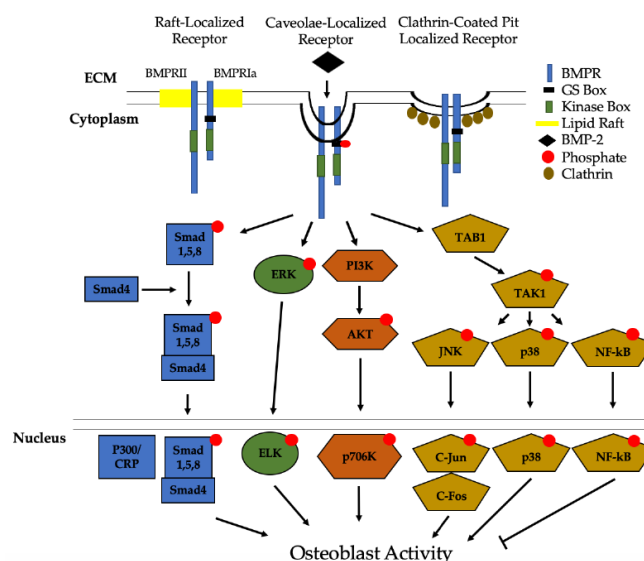


Abb. 3: Schematische Darstellung des BMP-2 Signalweges (84)

5.5.3 Klinische Anwendung von BMPs

Gegen Ende der 80er-Jahre wurden BMPs erstmalig für die Frakturheilung und Behandlung von Pseudarthrosen angewendet. Während die ersten Studien noch mit humanen BMP (hBMP) durchgeführt wurden (93), konnte bald darauf mit gentechnisch hergestellten, rekombinanten BMPs (rhBMP) gearbeitet werden. Im Vergleich zu anderen bekannten Wachstumsfaktoren besitzen BMP-2 und BMP-7 die größten knochen-induzierenden Eigenschaften (94, 95). Eine Zulassung für die klinische Anwendung durch die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) erfolgte 2001 für das rekombinante BMP-7 (Indikationen u. a.: Behandlung von Pseudarthrosen nach Unterschenkelfrakturen, posterolaterale Wirbelkörperarthrodesen) und 2002 für das rekombinante BMP-2 (Indikationen u. a.: Lendenwirbelfusionen bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen, offene Tibiafrakturen) (96). In Studien zeigte rhBMP-7 bei therapieresistenten tibialen Pseudarthrosen (97) ähnliche Heilungsraten wie der Goldstandard der autologen Beckenkammpongiosa (98) und rhBMP-2 führte bei Patienten mit offenen Tibiaschaftfrakturen zu einer signifikant schnelleren Frakturheilung (99, 100). Dass humane Studienergebnisse die sehr guten Daten tierexperimenteller Studien (99) nur bedingt reproduzieren konnten, könnte daran gelegen haben, dass die meisten Tiermodelle die im realen Leben oft bestehenden kritischen Weichteilverhältnisse und eingeschränkte Durchblutung meist nicht abbilden. Zusätzlich bedarf es einer sehr viel höheren Dosis an rekombinanten Wachstumsfaktoren, um einen osteo-induktiven Effekt zu erzielen, als physiologisch vorliegend (61, 99), was zu Nebenwirkungen, wie ektopter Knochenbildung oder Ödemen, führen kann (101). Hinzu kommt, dass für das pharmakologische Profil von freigesetztem rhBMP-2 eine Halbwertszeit von unter 10 min beschrieben wurde (61). Wünschenswert bei der Frakturheilung wäre aber eine gleichbleibende lokale Konzentration für einen längeren Zeitraum. Unter den alternativen Applikationswegen für Wachstumsfaktoren könnte die im Folgenden beschriebene regionale Genterapie einen interessanten Ansatz darstellen (102).

5.6 Genterapie als Ansatz der Therapie bei Frakturen

5.6.1 Formen der Genterapie

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) definiert Genterapie als „das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen“ (103). Über das Einbringen

von Fremd-DNA in eine Zielzelle kann es hierbei z. B. zur Eigensynthese eines Wachstumsfaktors kommen (104). Dadurch könnte eine langfristige Synthese und Freisetzung von Proteinen ermöglicht werden, die normalerweise eine kurze Halbwertszeit haben oder oral nicht applizierbar sind (104).

Grundsätzlich wird die somatische Gentherapie von der Gentherapie in der Keimbahn unterschieden. Dabei liegt bei beiden Formen das Ziel in der Synthese eines gewünschten Proteins der behandelten Zelle, um daraus einen therapeutischen Nutzen zu erzielen (105).

Bei der **Keimbahntherapie** kommt es zur Einschleusung des entsprechenden Gens in die Keimzellen und somit zur Übertragung auf Nachkommen. Da dies mitunter unbeherrschbare und ethisch bedenkliche Risiken birgt, ist diese Form der Gentherapie weltweit verboten (106).

Bei der **somatischen Gentherapie** wird das Gen nicht in die DNA des behandelten Individuums eingeschleust und somit nicht auf Nachkommen übertragen. Dabei wird eine Anwendung in ex vivo und in vivo unterschieden (Abb. 4).

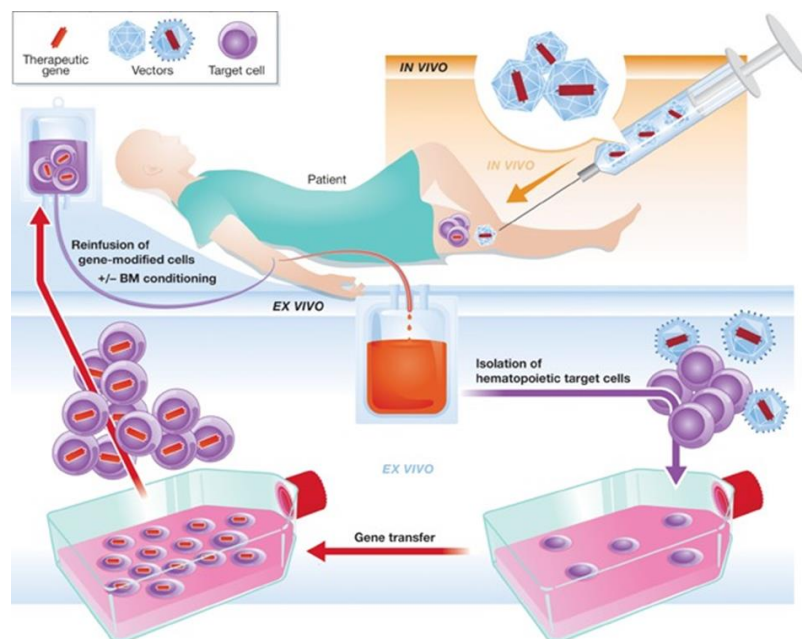


Abb. 4: Schematische Darstellung der Gentherapieformen (107)

Bei der **ex-vivo**-Strategie werden Zellen aus dem Körper des Individuums isoliert, in Zellkulturen mit dem entsprechenden Gen transfiziert und anschließend wieder in das Individuum eingeschleust. Diese Methode ist jedoch auf Zellen beschränkt, die sich gut

aus dem Organismus isolieren und vermehren lassen. Zusätzlich besteht durch die zweizeitige Entnahme und Re-Implantation der Zellen ein vermehrter Zeitaufwand (102). Bei der **in-vivo**-Behandlung werden Gene direkt in die dafür vorgesehenen Zellen des Individuums durch einen Carrier transportiert. Für die Einschleusung genetischen Materials in die Zelle wird als Vehikel ein sog. Vektor benötigt. Dabei wird zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren unterschieden.

5.6.2 Die Sicherheit der somatischen Gentherapie

Der Sicherheitsaspekt ist ein wichtiger Faktor bei der Gentherapie. Seit Zulassung der ersten klinischen Gentransfer-Studie wurden über 2000 weitere humane Gentherapie-Studien durchgeführt (108). Bei den wenigen beschriebenen Todesfällen nach klinisch-therapeutischem Einsatz (109, 110) wurden virale Vektoren verwendet, weshalb diese gefährlicher als nicht-virale Vektoren eingeschätzt werden. Wichtig ist dabei, dass die lokale Applikation von Genen zu keiner systemischen Reaktion führt. Hierfür werden oft Reportergene benutzt, d. h. Gene oder Genfragmente, welche an andere Gene gekoppelt werden, um deren Aktivität nachweisbar zu machen (111). Vorteilhaft ist eine einfache, schnelle und spezifische Quantifizierung (111), wie z. B. mit der Luciferase, die als Leuchtzym des Glühwürmchens mittels Enzyme-linked Immunosorbent-Assay (ELISA) oder Polymerase-Chain-Reaction (PCR) nachgewiesen wird. Somit kann eine systemische Expression innerhalb der jeweiligen Studie entweder nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

5.6.3 Vektoren in der Gentherapie

Als Vektoren kommen in der Medizin am häufigsten verschiedene Varianten von Viren zum Einsatz (Abb. 5) (112-114).

Vektorenarten in der Gentherapie

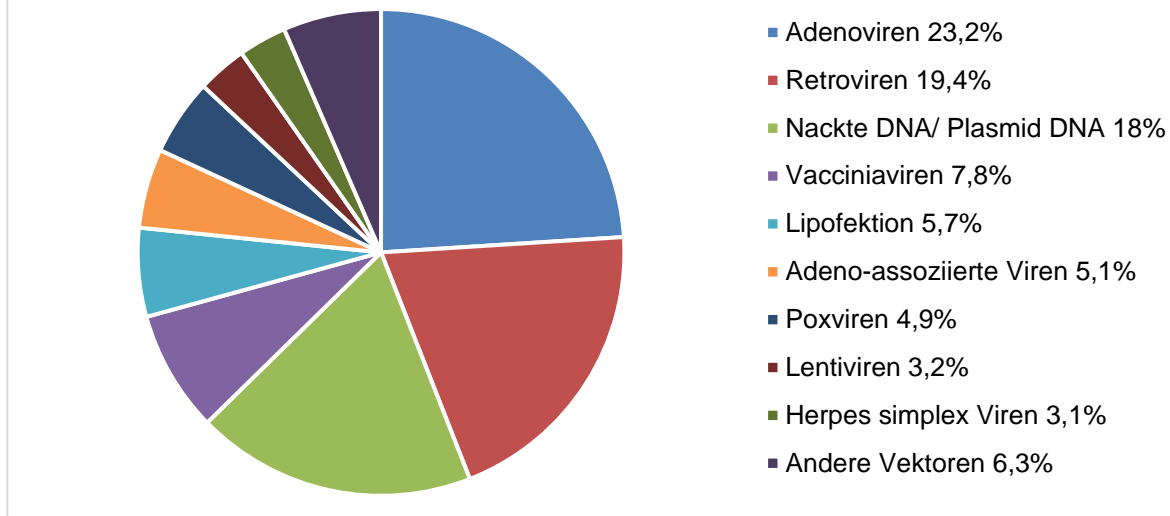


Abb. 5: Überblick über die verschiedenen Vektorarten, welche in klinischer Erforschung sind (modifiziert nach Ginn et al. 2013 (115))

Überwiegend handelt es sich dabei um Adenoviren, Retroviren oder Adeno-assoziierte Viren. Als nicht-virale Vektoren stehen z. B. nackte DNA oder Lipoplexe zur Verfügung. Die wichtigsten physikalischen Methoden stellen die freien Nadelinjektionen und die Elektroporation dar (116). Beim DNA-Transport durch einen viralen Vektor wird dies Transduktion genannt, bei nicht-viralen Vektoren hingegen Transfektion (117). Die Transduktion ist bisher die effizienteste Methode, um genetisches Material in Zielzellen zu bringen (116, 118-120). Auch in Frakturheilungsstudien wurden gentherapeutisch bereits virale Vektoren eingesetzt (121, 122), i. S. von genaktivierten Matrices (123), perkutanen Injektionen (124) oder direkt intraoperativ (125). **Virale Vektoren** haben jedoch auch Nachteile, wie die Provokation von Immunantworten bis hin zum anaphylaktischen Schock (119). Eine starke immunogene Antwort rufen dabei vor allem Capsid-Proteine hervor (126). Zusätzlich besteht bei einigen viralen Vektoren die Gefahr der Integration in das Genom der Wirtszelle mit unkontrollierbarem Wachstum bis zur malignen Entartung (127, 128). **Nicht-virale Vektoren** bieten eine im Vergleich geringere Effizienz, besitzen aber eine geringere Toxizität und provozieren somit eine geringere Immunantwort (102). Zudem findet keine Integration ins Genom der Zielzelle statt (102). Durch eine einfachere Produktion lassen sich größere Mengen dieser Vektoren herstellen (129). Beim nicht-viralen Gentransfer stellt der Transport der DNA in die Zelle das größte Problem dar. Beim Einsatz nackter DNA wird dies mittels chemischer Methoden, wie der

Komplexbildung mit Calciumphosphat oder Diethyl - aminoethyl, unterstützt (130). Bei physikalischen Methoden, wie der Elektroporation, bringen elektromagnetische Felder durch Erhöhung der Zellpermeabilität größere DNA-Mengen in Zellen (131, 132). Beim Gentransfer mittels der sog. Gen-Gun werden DNA-beschichtete Goldpartikel direkt durch die Zellwand in die Zelle bzw. in den Zellkern verbracht (133, 134). Der **lipidvermittelte Gentransport** nutzt positiv geladene Lipide für den Transport (133). Die hohe Leistungsfähigkeit dieser Moleküle ist in vitro oft beschrieben, doch die Effizienz im In-vivo-Milieu nicht ausreichend bewiesen (129). Eine Alternative ist der **peptid-getriggerte Gentransfer**, bei dem positiv geladene Polypeptide (z. B. Poly-L-Lysin, PLL) den Zelleintritt der DNA chemisch über Interaktion mit Zelloberflächen-Bindungs-Liganden ermöglichen (129, 135).

Während die vorbeschriebenen Methoden der ersten Generation von Genfähren zugeordnet werden, gehören die sog. **Polymere** zur zweiten Generation. Hohe Aufmerksamkeit als Gentransportsysteme wurde dabei biologisch abbaubaren Polymeren gewidmet (136, 137), die einen temporären Gentransfer gewährleisten und somit eine gewisse Sicherheit bieten (138). Eine Weiterentwicklung sind polykationische Polymere (139), die mit negativ geladenen Nucleinsäuren über elektrostatische Wechselwirkungen kleine Komplexe bilden, sog. Polyplexe (140). Damit ist die zu transportierende DNA auf dem Weg zum Zellinneren weitestgehend vor dem enzymatischen Abbau durch Nucleasen geschützt (141, 142). Hier hat sich das Polyamin Polyethylenimin aufgrund seiner einfachen Handhabung und Modifizierbarkeit als günstig erwiesen (103). **Polyethylenimine (PEI)** bestehen zum größten Teil aus primären, sekundären und tertiären Aminen und sind effiziente Carrier mit einer hohen positiven Ladung (143). Sekundäre und tertiäre Amine verändern nach Einschleusung in das Endosom den pH-Wert und die Osmolarität, was zum Anschwellen und Platzen von Lysosomen führt (144, 145). Damit werden die Polyplexe ins Zytosol freigesetzt und die zu transfizierende DNA befindet sich in der Zelle (144, 145). Zu den Nachteilen der PEI gehört, dass sie in Verbindung mit DNA unter physiologischen Bedingungen schlecht löslich sind (146), die in vitro nachgewiesenen hohen Transfektionsraten in vivo nicht reproduzierbar waren (147) und es teils zu akuten Intoxikationsreaktionen und Bildung von Erythrozyten-Konglomeraten kam (147). Um dieses Problem zu lösen, wurden Copolymere entwickelt, die Verbindungen aus einem positiv geladenen PEI und einer hydrophilen Gruppe darstellen. Die Kombination mit Polyethylenglycol (PEG) als

hydrophilem Segment mit PEI besitzt dabei eine niedrigere Zytotoxizität und eine höhere Löslichkeitsrate (148-151).

5.6.4 Copolymer-protected Gene-Vectors (COPROGs)

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden die sog. COPROGs (*copolymer-protected gene vectors*) entwickelt (152): geschützte Polymere aus Plasmid-DNA, welche mit einem PEI durch elektromechanische Wechselwirkungen verbunden sind (Abb. 6).

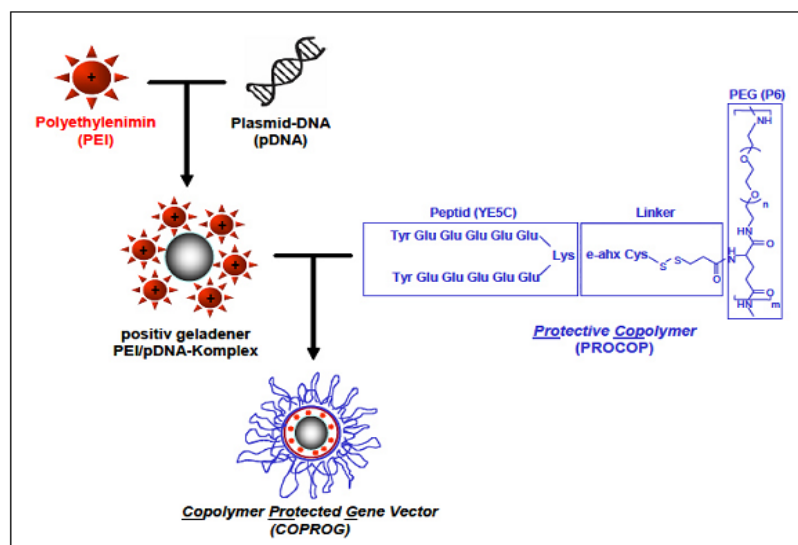


Abb. 6: Schematische Darstellung der Zusammenfügung der COPROGs (153)

An diesen positiv geladenen **Komplex** ist ein negativ geladenes PEG gebunden. Die Zytotoxizität dieser Verbindung kann durch ein Hüllpolymer verhindert werden (152). Per Elektronenmikroskop und dynamischer Lichtstreuung konnte nachgewiesen werden, dass COPROGs stabile Partikel kleiner Größe sind. COPROGs (P6YE5C) sind entwickelt worden, um Polykation-DNA-Vektoren – im Gegensatz zu „nackten“ Polyplexen – vor Inaktivierungen zu schützen, wie durch Salz- und Serum-Albumin-Aggregationen oder Interaktionen mit Serumproteinen (152). Ein weiterer Vorteil der COPROGs ist eine reversible Bindung zwischen dem Copolymer und den PEI-Polyplexen. Dadurch können die PEI-Polyplexe aus dieser Bindung durch geladene Proteinstrukturen verdrängt werden und an die Zellmembran ankoppeln. Außerdem sind COPROGs einfach und relativ kostengünstig in der Herstellung (153). Wichtige Charakteristika non-viraler Genvektoren (wie Partikelgröße, Ladung, Anfälligkeit für Opsonierung und Toxizität)

können durch dieses Schutzpolymer kontrolliert werden, ohne die Gentransfer-Effizienz zu beeinflussen (152). Somit bieten sie eine bereits gut untersuchte Alternative zu viralen Transfer-Systemen (114, 153-155).

5.6.5 Poly-(D,L-Laktid) PDLLA

Die lokale Applikation von Wirkstoffen oder Arzneimitteln zur Anregung der Frakturheilung benötigt Transportsysteme, sog. Drug-Delivery-Systems. Hier konnte eine Poly-(D,L-Laktid-)Beschichtung (PDLLA) etabliert werden (156-159). PDLLA ist ein inertes, amorphes PLA-Stereo-Copolymer, welches durch Hydrolyse biodegradiert und schließlich als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden wird (160). In vitro behält PDLLA im Verlauf von bis zu 25 Wochen nahezu 100 % seiner Stabilität bei und wird bei guter Biokompatibilität in vivo vollständig abgebaut (161, 162). Mittels eines kalten Beschichtungsverfahrens entsteht eine bioaktive Beschichtung mit einer hohen mechanischen Stabilität (157). Die kalte Beschichtungstechnik erlaubt, dass auch hitzlabile Faktoren, wie z. B. Wachstumsfaktoren, eingebracht werden können, ohne ihre biologischen Eigenschaften zu verlieren. Zusätzlich zeigten Lagerungsversuche, dass die biologische Aktivität der eingebrachten Substanzen auch nach über 14 Monaten nicht abnahm (163). In vitro und in vivo wurde nachgewiesen, dass nach einem ersten initialen Peak nach weiteren 42 h ca. 50 % der eingearbeiteten Substanzen freigesetzt werden; in den folgenden 40 Tagen werden dann insgesamt 80 % kontinuierlich freigesetzt (158). Bei einem Versuch mit einem PDLLA- und rhBMP-2-beschichteten Marknagel im Frakturmodell konnte zudem bereits eine signifikant beschleunigte Frakturheilung nachgewiesen werden (79).

5.7 Ziele und Arbeitshypothesen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer lokalen Gentherapie zur Beschleunigung der Frakturheilung untersucht. Dafür wurde der neu entwickelte copolymergeschützte nicht-virale Genvektor COPROG in eine biodegradable PDLLA-Implantatbeschichtung eingearbeitet. Als genetisches Material wurden Plasmide benutzt, welche den Wachstumsfaktor BMP-2 kodierten. Eine zweite Plasmid-DNA, welche für das Reportergen Luciferase kodierte, diente dem Sicherheitsnachweis des geplanten Gentransfers. Es wurde sowohl in vitro an der Zellkultur die Transfektion getestet als auch in vivo am Frakturmodell der Ratte. Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

- 1 Osteoblasten lassen sich in der Zellkultur in vitro mittels nicht-viralem COPROG-basiertem Gentransfer mit Plasmid-DNA transfizieren.
- 2 In vivo lässt sich über einen lokalen, nicht-viralen COPROG-basierten Gentransfer von BMP-2-Plasmiden über eine PDLLA-Beschichtung für osteosynthetische Implantate in einem tibialen Frakturmodell der Ratte eine beschleunigte Frakturheilung nachweisen.
- 3 Der Gentransfer bleibt lokal begrenzt und führt nicht zu einer systemischen Distribution (dieser Punkt wird nur der Vollständigkeit für das Gesamtprojekt halber hier erwähnt, da er Teil einer anderen Doktorarbeit war).

6 Material und Methoden

Im Vorfeld zum in-vivo-Studienanteil wurden in einem in-vitro-Versuch Zellkulturen mit Rattenosteoblasten angelegt, um eine Expression von Wachstumsfaktoren nachzuweisen. Die Hauptstudie wurde mit einem in-vivo Rattenfrakturmodell durchgeführt, das bereits mehrfach im Rahmen ähnlicher wissenschaftlicher Fragestellungen im Kontext der Frakturheilung verwendet wurde (163-167). Die im Einzelnen verwendeten Materialien und Methoden werden nun im Folgenden erläutert.

6.1 Titanimplantate, Beschichtung und Plasmide

Die lokale Applikation der verwendeten Plasmide in dieser Arbeit erfolgte über eine etablierte sterile Implantatbeschichtungstechnik (156-158).

Hierfür wurde PDLLA (30 kD molekulares Gewicht; Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland) in Ethylacetat aufgelöst und mit COPROGs (Prof. Dr. med. C. Plank; Institut für Experimentelle Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) vermischt. Die sterilen Titan-Kirschner-(K-)Drähte mit einem Durchmesser von 1 mm (Fa. Synthes Co, Schweiz) wurden zweimal in die Beschichtungslösung getaucht, um sie dann unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen trocknen zu lassen. Als DNA wurden Plasmide benutzt (Plasmid Factory GmbH & Co. KG, Bielefeld, Deutschland). Als therapeutisches Gen diente p55pCMV-IVS-BMP-2 und als Reportergen p55pCMV-IVS-Luc+. Durch diese Weise wurde jedes Implantat mit ca. 40 µg DNA beschichtet.

Die Titanimplantate wurden mittels einer „kalten Beschichtungstechnik“ beschichtet, welche entwickelt wurde, um eine kontinuierliche Freisetzung der integrierten DNA zu gewährleisten. Sowohl in-vitro- als auch in-vivo-Untersuchungen ergaben eine hohe Bioverfügbarkeit mit einer hohen Stabilität von inkorporierten Wirksubstanzen bei einer durchschnittlichen Beschichtungsdicke von 14,8 µm auf Titan- und 10,7 µm auf Stahl-Drähten. Intramedulläre Implantations- und Explantationsversuche konnten einen Verlust der PDLLA-Beschichtung von weniger als 5 % zeigen (158).

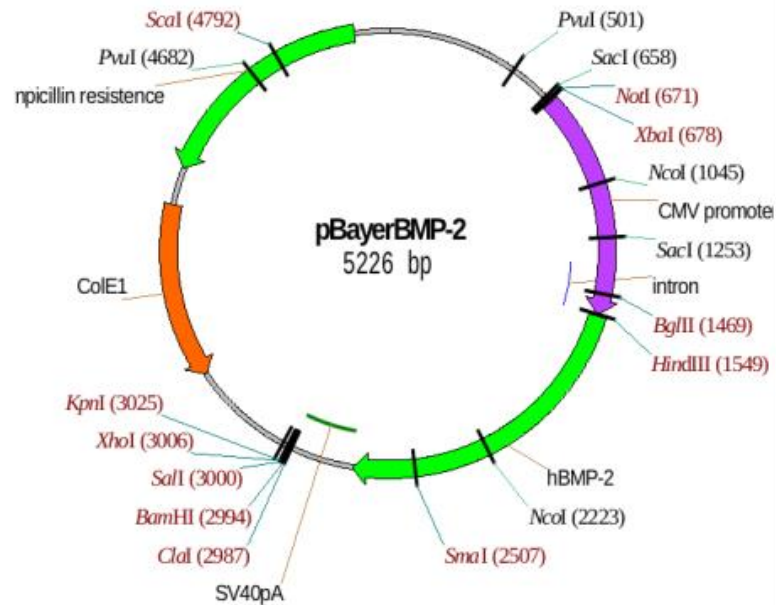


Abb. 7. Vektorkarte BMP-2 Plasmid (168)

6.2 Zellkulturen

Für die Zellkultur wurden primäre Rattenosteoblasten benutzt. Die Charakterisierung wurde mit der E11-Antikörperfärbung durchgeführt (169). Die Zellen wurden in Dulbeccos modifizierten Eagles-Medium (DMEM) kultiviert, welches 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin enthielt. Dann wurden die Zellen zu je 100 000 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte platziert und für die Transfektion die verschiedenen beschichteten K-Drähte zu den entsprechenden Zellen hinzugefügt.

Um zu beweisen, dass es zu einer Synthese von Faktoren aus der entsprechenden DNA kam, wurden zunächst zwei Gruppen analysiert. Die erste Gruppe beinhaltete die K-Drähte, welche mit PDLLA und COPROGs+Luciferase-Plasmid (40 µg) beschichtet waren. Die zweite Gruppe beinhaltete K-Drähte, welche mit PDLLA und nackten Luciferase-DNA-Plasmiden (40 µg) beschichtet waren.

Die Luciferaseaktivität wurde am Tag 6, 14, 21 und 28 aus dem Überstand mit dem Promega-Luciferase-Assay (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) und dem Luminometer (Berthold Technologie, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Dann wurde die Luciferase-Aktivität (RLU – Relative Lights-Units) in Relation zur totalen Proteinkonzentration (µg) gesetzt, welche mit dem Coomassie-Protein-Assay gemessen wurde.

In einem zweiten Versuch wurde die Menge an humanem BMP-2 im Überstand gemessen, welche von den Rattenosteoblasten produziert wurden, nachdem K-Drähte mit einer COPROGs+BMP-2-Plasmid-Beschichtung (40 µg) zur Zellkultur hinzugefügt wurden. Als Kontrollgruppe wurden hier Zellkulturen mit K-Drähten versetzt, welche nur mit COPROGs und ohne Plasmide beschichtet waren. Das humane BMP-2 wurde am Tag 2, 4, 6, 8, 10 und 12 mittels ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) gemessen.

6.3 Versuchstiere

Für die Versuchsreihe wurden 145 5–6 Monate alte weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 g verwendet (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland). Bevor die Operationen beginnen konnten, standen die Tiere 10 Tage zur Eingewöhnung in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum.

Die Versuchstiere wurden in Typ-3-Käfigen zu je 4 Tieren gehalten. Sie wurden an einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gewöhnt und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Nahrung (V – Alleinfutter für Ratten/Mäuse-Haltung, Sniff-Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

Der Antrag zur Bewilligung dieser Versuchsreihe wurde unter der Nr. G 0088/03 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt.

In der Arbeitsgruppe wurde das verwendete Rattenfrakturmodell etabliert und konnte bereits erfolgreich in vorangegangenen Studien eingesetzt werden (170). Es ist standardisiert, modifiziert nach Bonnarens (170), womit eine valide Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden kann (170).

6.3.1 Gruppeneinteilung und Versuchsplan

Die Ratten wurden randomisiert durchnummeriert und in 4 Gruppen eingeteilt:

Gruppe I (Kontrolle 1):	Unbeschichtetes Titanimplantat
Gruppe II (Kontrolle 2):	Titanimplantat mit COPROGs beschichtet
Gruppe III (COPROG BMP):	Titanimplantat mit COPROGs + BMP-2 beschichtet

Gruppe IV (COPROG Luc): Titanimplantat mit COPROGs + Luciferase beschichtet

Gruppe	Implantat = K-Draht	Analyse	Tag 2	Tag 4	Tag7	Tag 28	Tag 42
I	unbeschichtet	Biomechanik Histologie				n=10 n=10	n=10 n=10
II	+ PDLLA + COPROGs ohne DNA	Biomechanik Histologie				n=10 n=10	n=10 n=10
III	+ PDLLA + COPROG+ BMP-2 40µg	Biomechanik Histologie				n=10 n=10	n=10 n=10
IV	+ PDLLA + COPROG+ Luc 40µg	Luciferase PCR	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5

Tab. 1: Versuchsplan

Von den 145 verwendeten Ratten wurden in der Gruppe I, II und III jeweils 10 Tiere biomechanisch getestet und 10 Tiere histomorphometrisch aufgearbeitet. Die Tiere der Gruppe IV stellten die Kontrollgruppe bezüglich der lokalen und systemischen Transfektion dar und wurden mittels Luciferase-PCR ausgewertet (Die Histologie und die Transfektionsanalyse waren nicht Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit und werden hier nur zur Vollständigkeit erwähnt).

6.3.2 Frakturmodell und Frakturmaschine

Bei allen Versuchstieren wurde eine standardisierte Fraktur der rechten Tibia und Fibula durch eine Frakturmaschine (Abb. 8) gesetzt. Dabei war es das Ziel, eine geschlossene Querfraktur des Tibiaschaftes und der Fibula mit nur minimalem Weichteilschaden zu erreichen. Die Funktion der Frakturmaschine basierte auf dem Prinzip der Dreipunktbiegung. Das nach außen rotierte Bein wurde auf zwei Schienen gelagert, welche einen Abstand von 20 mm hatten, und dann mit einer variabel verstellbaren Stopplatte fixiert. Damit die entsprechende Extremität fest in der eingestellten Position gehalten werden konnte, wurde ein durch drei Stifte geführter Stempel ca. 2–4 mm proximal des tibiofibularen Winkels auf dem Margo anterior tibiae platziert. Die Belastung der Tibia betrug 650 g, welches sich aus dem Gewicht des Stempels mit Führungsstange (50 g) und einem Schlaggewicht (600 g) zusammensetzte, welches sich in 15 cm Höhe befand. Wurde ein Haltestift manuell entfernt, fiel das Schlaggewicht auf den Stempel und es entstand durch die Schlagkraft ($F = 6,38 \text{ N}$) die geschlossene Fraktur von Tibia

und Fibula. Dabei wurde durch verstellbare Anschlagmuttern verhindert, dass der Stempel zu tief in die Extremität eindrang.

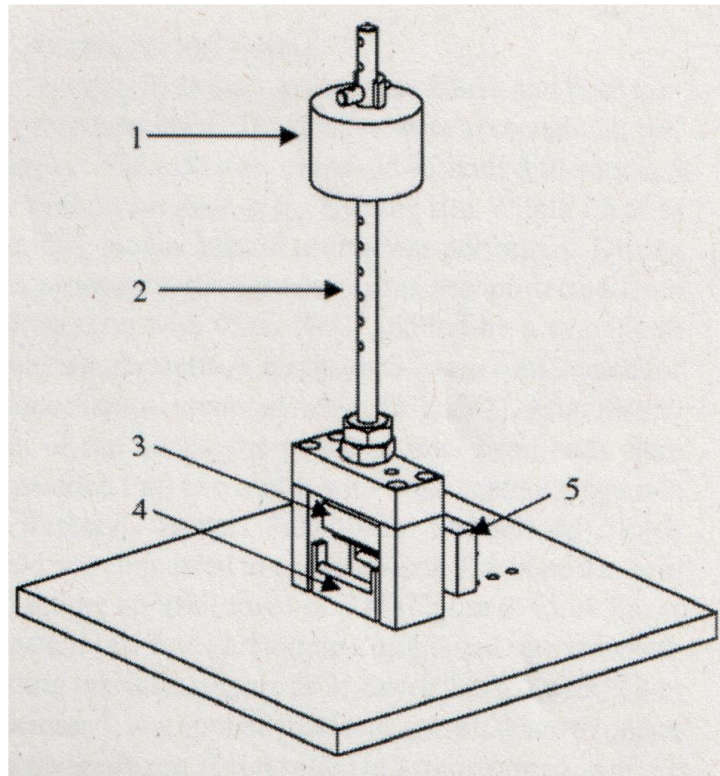


Abb. 8: Schematische Darstellung der Frakturmaschine, 1. Schlaggewicht; 2. Führungsstange; 3. Schlagwerkzeug; 4. Stützbloss; 5. Fixierungsplatte

6.4 Anästhesie und operatives Vorgehen

6.4.1 Verwendete Materialien

6.4.1.1 Anästhesie

Für die Narkose wurde das Narkosegerät Artec Typ Vet Nr. 10495186 (Stephan GmbH Medizintechnik, 56412 Gackebach, Deutschland) verwendet mit einer durch ein an- und abführendes Schlauchsystem daran befestigten Inhalationsnarkosebox sowie einer Inhalationsmaske. Für die Inhalationsanästhesie wurden 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether (Isofluran), Forene® (Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) sowie Lachgas (0,7 ml/min) und Sauerstoff (1 ml/min) verwendet. Für die intraperitoneale Anästhesie wurde Ketaminhydrochlorid, (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich) und Xylacinhydrochlorid 2 %, (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) injiziert.

6.4.1.2 Operation

Als Implantate wurden Titan-K-Drähte \varnothing 1 mm, L 280 mm (Fa. Synthes®, Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz) unbeschichtet bzw. mit verschiedenen Beschichtungen (COPROGs, COPROGs+BMP-2, COPROGs+Luciferase) verwendet. Das benötigte sterile OP-Besteck bestand aus einer Präparierschere, einer kleinen chirurgischen Pinzette, einem Nadelhalter, einer Kneifzange, 0,8 und 1 mm Stahl-K-Drähten (Fa. Synthes®, Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz) und einem Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan). Als Nahtmaterial wurde Prolene® 4-0, blau, nicht resorbierbar (Fa. Johnson&Johnson Medical GmbH, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), verwendet. Des Weiteren wurden ein Elektrorasierer Favorita II GT 104 (Aeskulap AG & Co. KG; Tuttlingen, Deutschland), Thioglycolsäure, Enthaarungscreme (Pilca®) (Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Deutschland) und ein Röntgen-Bogen, Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Deutschland) verwendet.

6.4.1.3 Eingangs- und Nachuntersuchungen

Für die jeweiligen Untersuchungen wurden benutzt: Filzstifte (Nr. 3000, Fa. Edding, Ahrensburg, Deutschland) in den Farben Schwarz, Blau, Grün und Rot; ein Bleistift; eine Präzisionswaage Typ TE6100 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland); ein digitales Thermometer (Paul Hartmann AG, Heidelberg, Deutschland); Zinkcreme (Penaten®, Johnson&Johnson, Düsseldorf, Hallein, Deutschland); Hämatokrit-Kapillaren 75 mm/60 μ l (Brand, Wertheim, Deutschland); Heparinnatrium (Liquemin® N25000) (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland); Serumröhrchen mit Gerinnungsförderer und Trenngel, 1 ml (Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland); Blutbildröhrchen mit EDTA 200 μ l (Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland); Eppendorfcaps 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); sterile Tuper 20 x 30 cm Gr. 3 (Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen, Deutschland); Dexpanthenol, Panthenol®-Augensalbe (Jenapharm, Biberach/Riss, Deutschland); eine Eppendorf-Zentrifuge 5414 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln-Berlin, Deutschland); ein Röntgengerät: Siemens Röntgenstrahler „Mobilett Plus“, Modell No. 6215300 X037E (Siemens AG, München, Deutschland); digitale Röntgenplatten: Fuji IP Cassette 3A, 24 x 30 cm (Fuji Photo Film Co., LTD, Japan); Röntgenzahlen; ein Pflaster Typ Leukosilk® (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland).

6.4.2 Durchführung Anästhesie

Alle Tiere wurden zunächst mit einer Inhalationsnarkose sediert. Dazu wurde jeweils ein Tier in eine speziell dafür konstruierte Narkosebox gesetzt, in welche durch ein Schlauchsystem ein definiertes Narkosegemisch (Isofluran 5 %, Lachgas 0,7 ml/min und Sauerstoff 1 ml/min) eingeleitet wurde.

Für die Nachuntersuchungen konnte die Narkose durch eine spezielle Inhalationsmaske aufrechterhalten werden, welche über Nase und Maul des Tieres gesetzt wurde.

Am Operationstag und für die Tötung am Ende der Standzeit wurde den Tieren jeweils eine intraperitoneale Injektionsanästhesie appliziert, gemäß einer Empfehlung des „Handbook of Laboratory Animal Management und Welfare“ von Sarah Wolfensohn (University of Oxford) (171). Die Injektionsanästhesie beinhaltete eine Mischung aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml; 80 mg/kg KG) und Xylacinhydrochlorid (12 mg/kg KG) in einem Verhältnis von 1,2:0,9 i. E. Damit wurde gewährleistet, dass die Tiere während der Operation und darüber hinaus für ca. 60 min vollständig sediert und analgesiert waren.

6.4.3 Durchführung Operation

Nachdem die Tiere narkotisiert waren (siehe 3.4.2), wurde zur Identifizierung der Schwanz nach einem festgelegten Code farblich markiert, Temperatur und Gewicht gemessen und Blut entnommen (siehe 3.4.4). Anschließend wurde die rechte untere Extremität mit der elektrischen Enthaarungsmaschine rasiert und danach mit Enthaarungscreme vollständig von allen Haaren befreit.

Die Operation fand unter aseptischen Bedingungen statt. Dafür wurde auf dem OP-Tisch ein steriles Tuch ausgebreitet und das sterile OP-Besteck angeordnet. Nach der Vorbereitung der Tiere wurden diese dann auf den Operationstisch umgelagert. Die zu operierende Extremität wurde intensiv desinfiziert und mit einem sterilen Tuch abgedeckt. Danach wurde mit dem Skalpell über der Tuberositas tibia eine ca. 3 mm lange Stichinzision vorgenommen, die Kortikalis der Tibia mit einem 1 mm Stahl-K-Draht durchbrochen und der Markraum nach distal vorsichtig dilatiert. Anschließend wurde mit dem 0,8 mm Stahl-K-Draht der Markraum weiter nach distal vorgebohrt. Nach Entfernung des Drahtes wurde unter Zuhilfenahme der Frakturmaschine eine komplette geschlossene Unterschenkelfraktur erzeugt (siehe 3.3.3). Die so entstandene Tibiafraktur wurde unter Bildwandlerkontrollen reponiert und mit den beschichteten oder

unbeschichteten Titan-K-Drähten intramedullär stabilisiert. Der überstehende Draht wurde mit einer Kneifzange entfernt und der Hautschnitt mit einem 4-0-Prolene®-Hautfaden durch Einzelknopfnähte verschlossen (Abb. 9). Nach letztmaliger Desinfektion wurde ein zirkulärer Leukoplast®-Verband zum Schutz und zur Stabilisierung angelegt. Zum Abschluss des Eingriffs wurde eine Röntgenaufnahme durchgeführt (siehe 3.4.4).

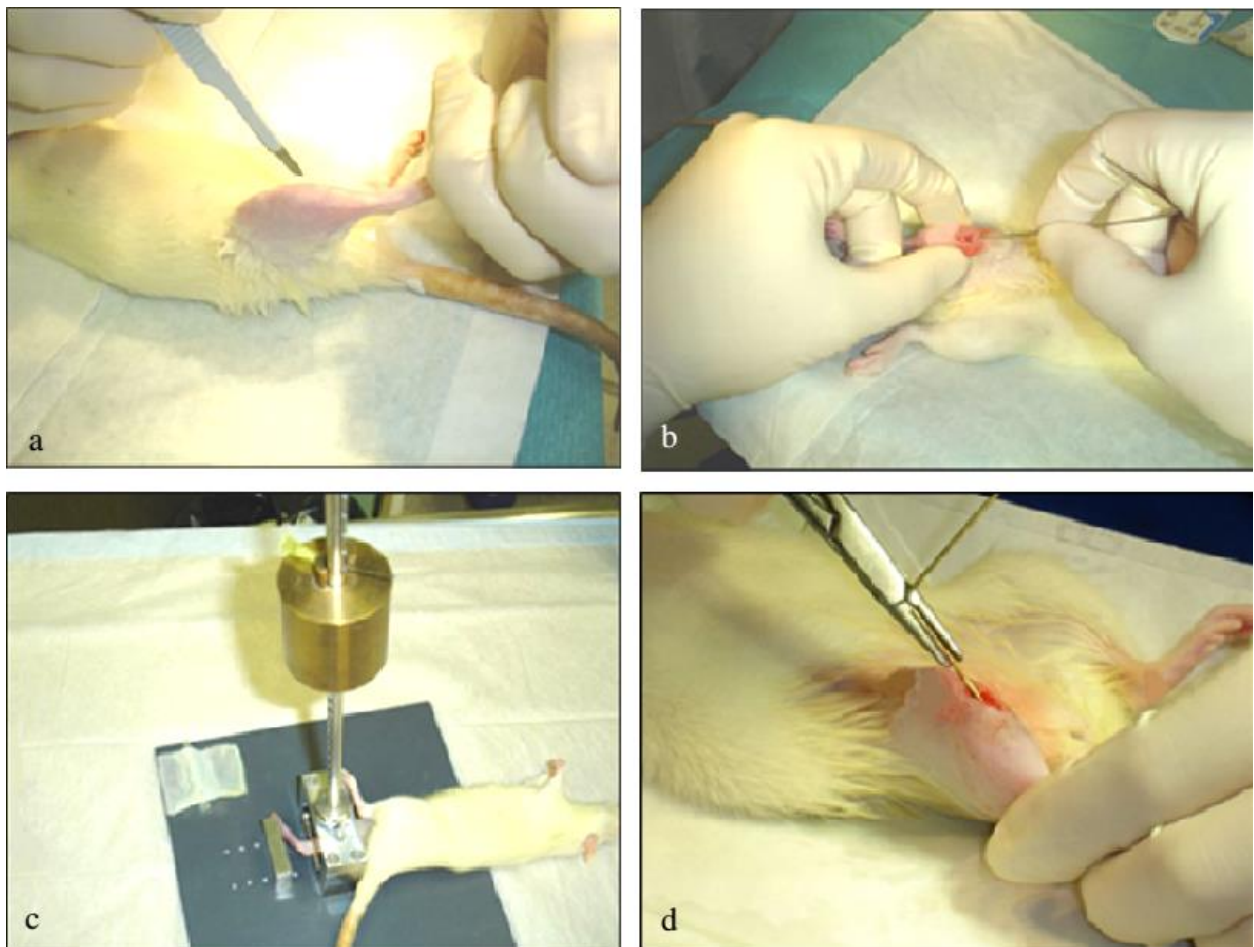


Abb. 9: Einzelne Operationsschritte, a: Hautinzision, b: Markraumeröffnung, c: Fraktursetzung, d: Osteosynthese (172)

6.4.4 Eingang- und Verlaufsuntersuchungen

6.4.4.1 Verwendete Materialien

Hierfür wurden die gleichen Materialien wie unter 3.4.1 beschrieben, benutzt.

6.4.4.2 Durchführung

Alle Tiere wurden – von der Standzeit abhängig – am Tag der Operation und in Folge dann wöchentlich untersucht.

Dabei wurde in einer Kurznarkose mittels Isofluran (siehe 3.4.2) eine Gewichtsbestimmung durchgeführt und die rektale Körperkerntemperatur bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Blutentnahme. Dafür wurde mit einer heparinisierten Hämatokritkapillare der retrobulbäre Venenplexus durch den medialen Augenwinkel punktiert (173). Dem narkotisierten Tier wurden damit ca. 1 ml Blut entnommen, entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde, wonach nicht mehr als 10 % des Gesamtblutvolumens entnommen werden sollte (174). Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 20 ml pro Tier lag die entnommene Menge stets sicher darunter. Das gewonnene Blut wurde in Serum und Blutbildröhrchen gesammelt und anschließend wurde das Serumröhrchen in einer Zentrifuge bei 12.000 U/min 10 min zentrifugiert. Das Serum wurde abpipetiert, um darin Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Glukose, Kreatinin, CRP sowie die alkalische Phosphatase zu bestimmen. Aus dem zweiten Röhrchen wurde das Blutbild mit Hämoglobinwert bestimmt. Nach der Blutentnahme wurde das Auge mit einem sterilen Tupfer komprimiert. Zu den Operationen wurden die Augen zum Schutz mit Panthenol®-Augensalbe behandelt.

Als letzte Untersuchung fand unmittelbar postoperativ sowie bei den jeweiligen Untersuchungsterminen und am Tötungstag eine Röntgenuntersuchung der operierten Extremität in 2 Ebenen statt (p. a. und lateral). Diese diente zum einen am OP-Tag zur Repositions- und Implantatkontrolle und zum anderen bei den Nachuntersuchungen zur Beurteilung der Frakturkonsolidierung. Zusätzlich konnte anhand der Röntgenaufnahmen eine eventuelle Infektion oder Implantatdislokation detektiert werden.

Für die Röntgenuntersuchung in lateraler Ebene wurde bei der narkotisierten Ratte – auf dem Bauch liegend – das rechte Hinterbein abduziert und außenrotiert auf der Röntgenplatte mit Leukosilk® fixiert. Die Aufnahme wurde mit einem Abstand von 60 cm bei einer Belichtungszeit von 1,8 mAs und einer Strahlenhärte von 55 kV durchgeführt. Danach erfolgte noch eine posterior-anterior Aufnahme. Zur sicheren Identifikation wurde für jedes Tier die entsprechende Röntgenzahl auf der Röntgenplatte platziert.

6.5 Nachsorge

Um eine ausgeprägte Hypothermie zu vermeiden, wurden die Tiere unmittelbar postoperativ in den Käfig zurückgelegt und mit frischer Sägespaneinstreu umgeben. Postoperativ wurden die Tiere täglich visitiert, erhielten regelmäßig neue Streu und hatten freien Zugang zu frischem Wasser und Nahrung – entsprechend den hygienischen Standards in einer tierexperimentellen Einrichtung. Der operative Eingriff wurde gut toleriert und die Tiere erlangten alle in kurzer Zeit wieder ihre volle Aktivität.

6.6 Tötung, Knochen- und Gewebeentnahme

6.6.1 Materialien

Hierfür wurden benötigt: Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, USA); Einmalspritzen 5 ml (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland); Einmal-kanülen, steril, 24G (BD Microlance™, BD Drogheda, Irland); Kaliumchlorid 14,9 % (B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland); flüssiger Stickstoff; Einmalskalpelle (Aeskulap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland); Eppendorfcaps 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); Präparierschere; Pinzette; isotonische Kochsalzlösung Plastipur® (Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland); Mullkompressen 10 x 10 cm 8-fach, BEESANA® (Karl Beese GmbH & Co. KG, Bursbüttel Deutschland).

6.6.2 Durchführung

Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit (28 und 42 Tage) wurden die Tiere nach der Kontrolluntersuchung (siehe 3.4.4) getötet. Dafür wurden sie mittels Inhalationsnarkose (siehe 3.4.2) sediert und erhielten dann ca. 1 ml einer 14,9 %-Kaliumchloridlösung intrakardial appliziert. Den Tieren der Gruppe I, II und III wurden jeweils für die biomechanische Testung beide Tibiae entfernt; für die histomorphometrische Analyse (nicht Teil dieser Arbeit) wurde nur die operierte Tibia entfernt. Hierzu wurde die Tibia freipräpariert und sowohl im Knie als auch im Sprunggelenk exartikuliert. Danach wurde der Knochen vorsichtig von sämtlichem umgebenen Weichteilgewebe unter Schonung des Periosts befreit und das Titanimplantat entfernt. Zusätzlich wurde die Fibula reseziert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Tibiae in mit 0,9 % NaCl angefeuchtete Kompressen gehüllt.

Für die PCR-Untersuchungen (nicht Teil dieser Arbeit) wurden den Tieren aus der Gruppe IV jeweils die rechte Tibia und Gewebeproben von Gehirn, Lunge, Leber, Milz, Niere, Ovarien und Muskel entnommen. Als Muskel diente der M. tibialis anterior der kontralateralen Seite. Die Proben wurden in Eppendorfcaps verbracht und sofort in flüssigem $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ Stickstoff tiefgekühlt.

Die Histologie und Transfektionsanalyse sind nicht Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit und wurden nur zur Vollständigkeit erwähnt.

6.7 Biomechanische Testung

6.7.1 Materialien

Für die biomechanische Testung wurden verwendet: Einmalhandschuhe (Johnson & Johnson Intl., New Brunswick, USA); Einmalspritzen, 10 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland); Zement: kaltpolymerisierender Kunststoff, Dibenzoylperoxid, gelb, 1000 g Methylmethacrylat, N,N-dimethyl-p-toluidin, 1000 ml, Technovit® 3040 (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) isotonische Kochsalzlösung Plastipur® (Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland); eine Haltevorrichtung; ein Messschieber; Klemmen; Einbettformen (Außendurchmesser 3 cm x 3 cm x 2,5 cm, Innendurchmesser 1,1 cm x 1,1 cm x 1,5 cm); ein Winkel (DIN 875/1, Fa. ORION, Deutschland); eine Materialprüfmaschine 1455 (Zwick, Ulm, Deutschland) mit Kraftmessdose CM 30N D (Wazau Mess- und Prüfsysteme GmbH, Berlin); eine Spezialsoftware: Catman 2.1.® (HBM, Darmstadt, Deutschland), Excel (Fa. Microsoft, Redmond, USA); zwei Rechner; ein Drucker.

6.7.2 Durchführung

10 Tiere pro Standzeit (28 und 42 Tage) aus der Gruppe I–III wurden einer biomechanischen Testung unterzogen. Dabei wurde jeweils die frakturierte Tibia mit der unfrakturierten Gegenseite eines Tieres auf Torsionsmoment und Steifigkeit geprüft und miteinander verglichen.

6.7.2.1 Einbettung

Durch Fassklemmen gehalten wurden die Tibiae in eine spezielle Haltekonstruktion eingespannt und so ausgerichtet, dass der distale Anteil ohne Bodenkontakt in die

Einbettform positioniert werden konnte. Die exakte Ausrichtung erfolgte durch eine Visiervorrichtung aus Plexiglas. Dann wurde der Zement erstellt und mit einer 10-ml-Spritze in die Einbettform gefüllt. Nach Aushärten des Zements wurde die Einbettform selbst in die Haltevorrichtung eingespannt und das proximale Ende auf gleiche Weise in die zweite Einbettform gebettet, sodass über eine Länge von 18 mm die Diaphyse senkrecht zur Testung frei lag. Um eine Austrocknung des Knochens zu vermeiden, wurde dieser mit einer kochsalzgetränkten Kompresse umhüllt (Abb. 10).

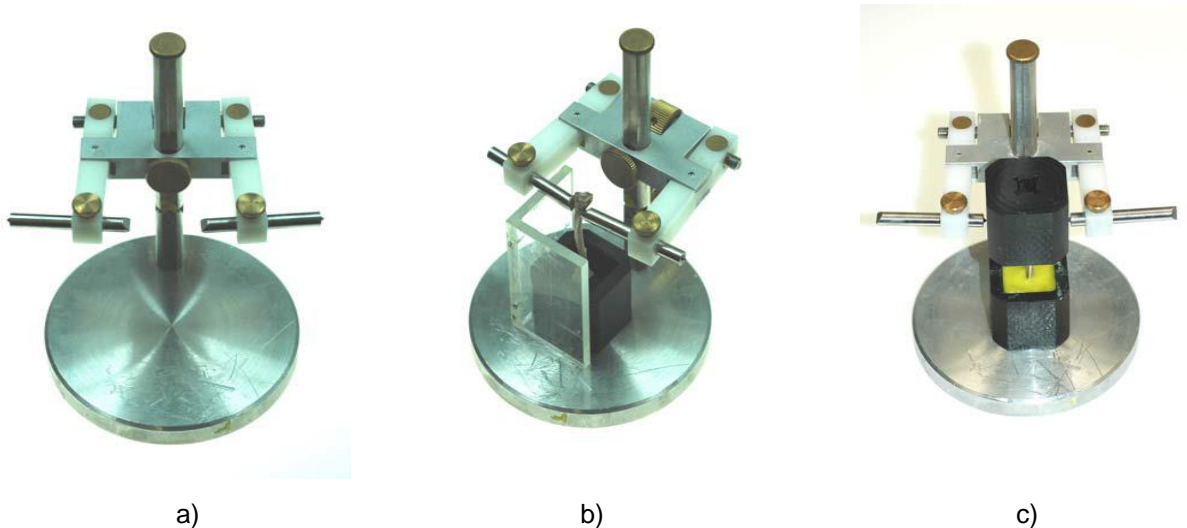


Abb. 10: a) Haltevorrichtung, b) Haltevorrichtung mit eingebetteter Tibia und Visierhilfe c) vollständig eingebettete Tibia (Eigene Darstellung der Arbeitsgruppe)

6.7.2.2 Die Torsionsmaschine

Die Torsionsmaschine (Abb. 11) wurde eigens zur biomechanischen Testung von kleinen Röhrenknochen entwickelt. Die aus Aluminium gefertigte Konstruktion war auf einer Grundplatte aufgebaut, welche am Testungstag in die Materialprüfmaschine eingespannt wurde. Die einzelnen Bauteile waren:

- (1) Zwei Einbettformen zur Fixierung der Knochen
- (2) Ein Stempel, auf dem eine lineare konstante Kraft einwirkt, welche durch die Materialprüfmaschine (Zwick) aufgebracht wurde
- (3) Zwei Hebelarme für die Übertragung der Kraft auf die Rotationsachse
- (4) Zwei Nadellager, um die Reibung zu minimieren
- (5) Ein Dehnungsmessstreifen zur Messung des Drehmoments
- (6) Eine axiale Vorlast über 5 N

(7) Computer (nicht abgebildet) zur Berechnung der maximalen torsionalen Belastung und maximalen Steifigkeit (Software: Catman®)

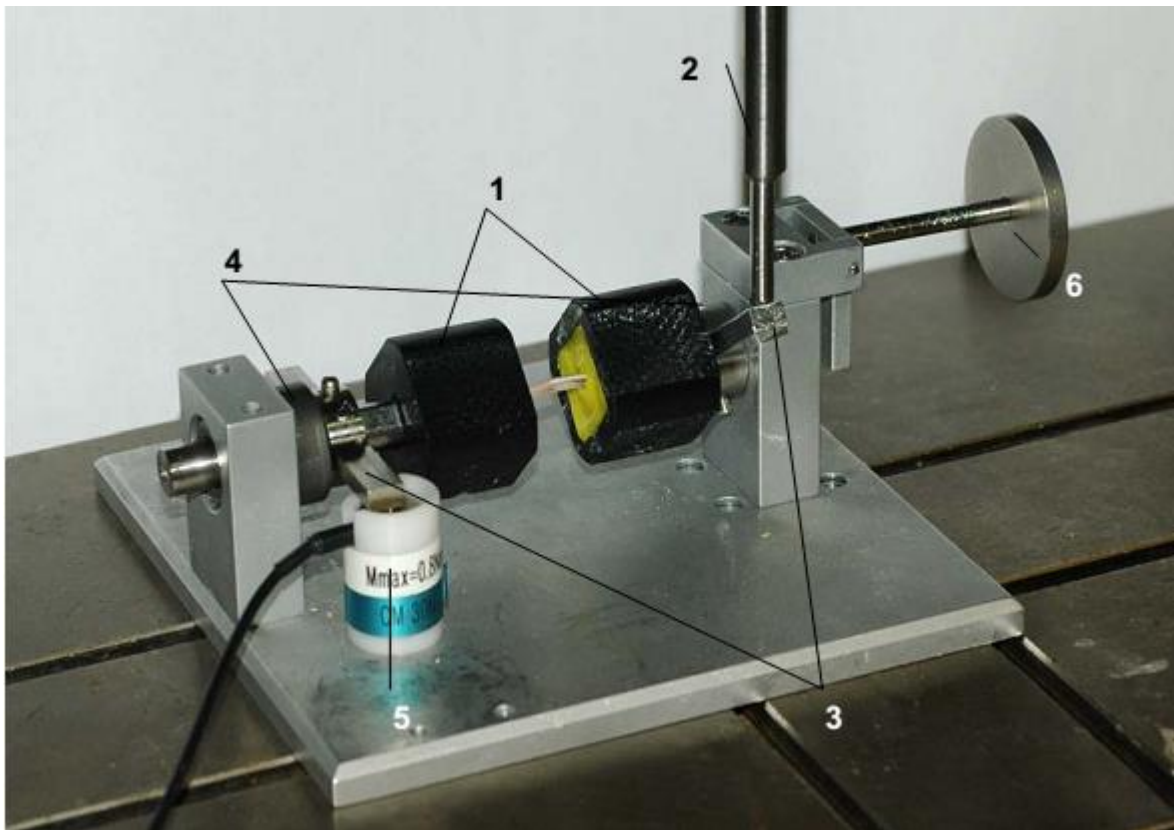


Abb. 11: Torsionsmaschine zur biomechanischen Testung der eingebetteten Tibiae (Bezeichnung der Bestandteile im Haupttext von Kapitel 3.7.2.2) (Eigene Darstellung der Arbeitsgruppe)(168)

6.7.2.3 Die Torsionsmessung

Nachdem der jeweilige Knochen in den Einbettformen fixiert wurde, erfolgte das Einspannen in die Torsionsmaschine, welche vorher in der Materialprüfmaschine arretiert worden war. Der Knochen wurde mit einer axialen Vorlast von 5 N vorbelastet, um einen gleichmäßigen Druck auf den gesamten Knochen zu bewirken und damit die Kräfte von Zugbelastungen zu minimieren, welche bei torsionalen Testungen auftreten und auf Längenänderungen beruhen.

Dann erfolgte durch die Materialprüfmaschine eine lineare Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit auf den Hebelarm, welche in einer Torsionsbewegung auf die Tibia resultierte. Somit wurde aus Hebelarmlänge und Kraftwirkung das Drehmoment ermittelt und konstant aufgezeichnet. Zum Abbruch der Messung kam es durch die Maschine dann, wenn das maximale Drehmoment erreicht war und der aktuell gemessene Wert mehr als 8 % unter dem zuvor gemessenen Wert lag.

Die erhaltenen Daten wurden über einen Messkraftverstärker in einen Computer übertragen und als Funktion dargestellt.

6.7.2.4 Auswertung der Daten

Die durch den Messkraftverstärker MGC aufgenommenen Werte wurden im Catman-2.1.®-Programm als Datei „ASC II mit HEADER“ gespeichert. Somit konnten in Folge die maximalen Werte von Drehmoment (Nmm), Kraft (N) und Masse (g) berechnet werden. Für die Auswertung wurde das maximale Drehmoment (Hebelarmlänge x Kraftwirkung) und die maximale torsionale Steifigkeit (Drehmoment / Winkeländerung) benötigt. Zur Berechnung der Steifigkeit mussten die Daten formatiert und in Excel® eingelesen werden. Bei jeder Testung wurden jeweils ca. 5000 Werte aufgezeichnet, wobei die ersten 50–150 Werte als Setzungsartefakte verworfen wurden. Die übrigen Daten wurden umgewandelt und als Graph dargestellt. Dabei stellte die X-Achse die „Winkeländerung des Knochens“ (°) und die Y-Achse das Drehmoment (Nmm) dar. Die Steifigkeit des Knochens konnte somit aus der Steigung des Graphen ($m = Y_b - Y_a / X_b - X_a$) ermittelt werden. Es wurden jeweils die frakturierte Tibia und die unfrakturierte kontralaterale Tibia eines Tieres gemessen, miteinander verglichen und in Prozent ausgedrückt $[(\text{frakturiert} / \text{unfrakturiert}) \times 100]$. Aus diesen Ergebnissen wurde das arithmetische Mittel gebildet $[(X_1 + X_2 + \dots + X_{10}) / 10]$ und die Standardabweichung ermittelt (Abb. 12).

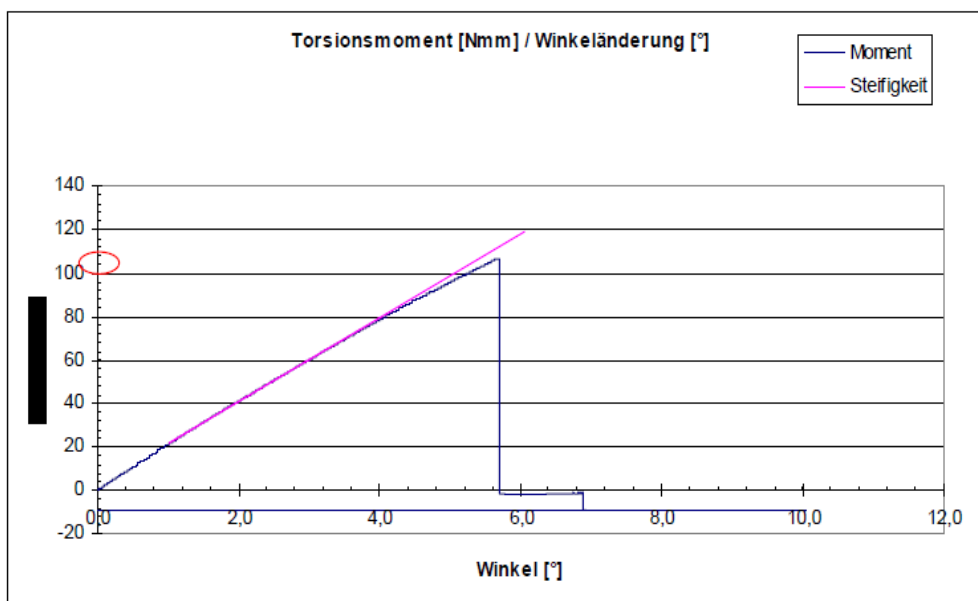


Abb. 12: Testkurve einer Rattentibia mit Darstellung Torsionsmoment (Nmm) zur Winkeländerung (°)

6.8 Die histomorphologische Untersuchung (Nicht Teil dieser Promotion)

Für die histomorphologische Untersuchung wurden nach einer Standzeit von 28 und 42 Tagen nach der initialen Operation 10 Tiere je Gruppe getötet (siehe 3.6.2) und die frakturierte Tibia verwendet. Nach der Präparation des Knochens aus dem umgebenen Weichteilgewebe wurde der implantierte K-Draht vorsichtig aus dem intramedullären Kanal gelöst und der Knochen danach für 2 Tage in normalgepufferten 10 % Formaldehyd fixiert. Im Anschluss folgte eine Dehydratisierung in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen und Einbettung in Methylmetacrylat (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Deutschland). Unter Zuhilfenahme eines Mikrotoms (Leica, Deutschland) wurden 0,5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese mit v. Kossa und Safranin O./Light Green angefärbt. Mittels eines Mikroskops (Leica, Deutschland) und dem Bildanalyseprogramm Zeiss KS 400 (Zeiss, Deutschland) wurden daraufhin die histomorphometrischen Parameter gemessen (175). Es erfolgte die Unterteilung des Kallus in einen proximalen und distalen Teil. Um die Region of Interest (ROI) der Kallushälften zu definieren, wurde eine Länge von 1,5 mm des Tibia-Durchmessers verwendet. Dabei wurde der Gesamtdurchmesser in die ROI einbezogen. Verglichen wurden die mineralisierten Flächen der Kortizes, die Fläche des periostalen Kallus und das mineralisierte und knorpelige Volumen des Kallus. Die histomorphometrischen Untersuchungen waren Bestandteil einer weiteren Promotionsarbeit und sind hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

6.9 Die Untersuchung auf systemische Transfektion (Nicht Teil dieser Promotion)

In einer weiteren Gruppe der Versuchsreihe wurden jeweils 5 Tiere der Luciferasegruppe an den Tagen 2, 4, 7, 28 und 42 nach der initialen Operation getötet und auf eine möglicherweise erfolgte systemische Transfektion untersucht. Dafür wurden den Tieren neben der frakturierten Tibia Proben von Gehirn, Lunge, Niere, Eierstöcke, Leber, Milz und des ipsilateralen M. tibialis anterior entnommen und daraus RNA extrahiert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels reverser Transkriptase PCR amplifiziert. Dadurch konnte via Gelelektrophorese das Reporter-gen Luciferase und das House-keeping-Gen GAPDH nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen auf systemische Transfektion waren Bestandteil einer weiteren Promotionsarbeit und werden hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

6.10 Radiologische Auswertung

Die Röntgenauswertung wurde anhand der Röntgenbilder am Tötungstag vollzogen. Sowohl die a.-p.-Aufnahme, als auch die laterale Aufnahme gingen in die Bewertung ein, wobei geprüft wurde, wie viele Kortices überbrückt waren. War keine Kortikalis überbrückt, entsprach dies einer vorher durch die Arbeitsgruppe festgelegten Bewertung „A“; waren 1–3 Kortices überbrückt entsprach dies einem „B“; waren hingegen alle Kortices überbrückt, entsprach dies einem „C“ und damit einer vollständigen Konsolidierung.

6.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde unter Verwendung einer ANANOVA für unabhängige Proben ausgewertet und mittels Bonferoni-Korrektur korrigiert. Dabei wurden statistische Unterschiede bei einem Konfidenzniveau von 95 % definiert. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur Unterstützung der statistischen Auswertung wurde die Statistik-Software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois) verwendet.

7 Ergebnisse

7.1 In-vitro-Versuch – Zellkultur

7.1.1 Luciferase-Zellkultur

Die höchste Luciferase-Expression zeigte sich mit 16.000 RLU/ μ g in der Gruppe mit COPROG-/Luciferase-Beschichtung am Tag 6. Ab Tag 6 folgte eine kontinuierliche Abnahme der Expression. Am 21. Tag wurde eine Expression unter 400 RLU/ μ g gemessen und ab Tag 28 war keine Expression mehr nachweisbar.

In der Gruppe mit nackter DNA-Beschichtung fand sich eine maximale Expression am Tag 6 mit 646 RLU/ μ g. Zu allen anderen Zeitpunkten waren sehr geringe Ergebnisse messbar, welche als vernachlässigbar eingeschätzt wurden (siehe Abb. 13).

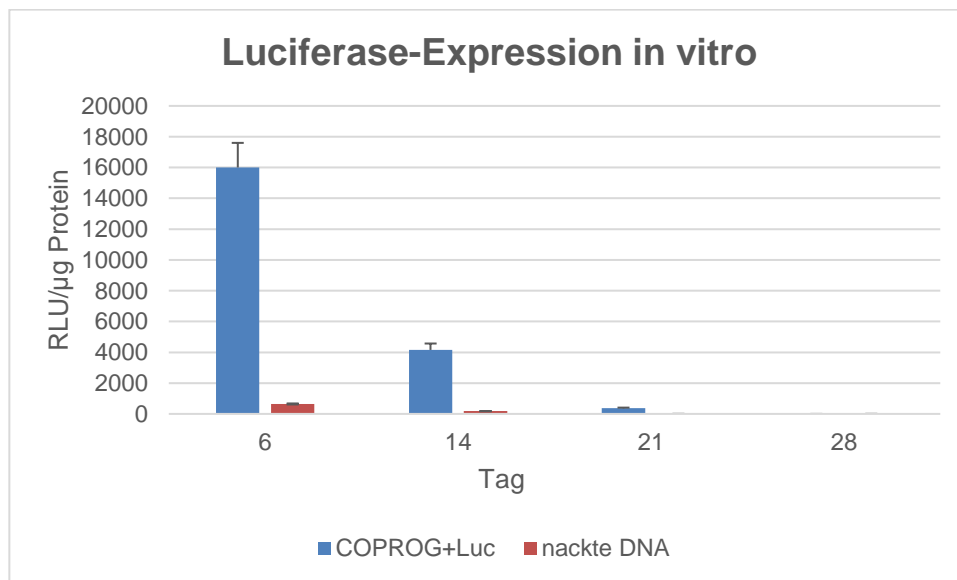


Abb. 13: In-vitro-Expression von COPROGs+Luciferase im Vergleich zu nackter Luciferase-DNA

7.1.2 BMP-2-Zellkultur

Im zweiten in-vitro Versuchsaufbau konnte bei den Rattenosteoblasten mit beschichteten K-Drähten aus PDLLA, COPROGs und 40 μ g BMP-2-Plasmid die höchste Konzentration an humanen BMP-2 an Tag 2 mit 116 pg BMP-2/ml gemessen werden. Die Expression nahm ab Tag 2 kontinuierlich ab. Am Tag 4 konnte eine Konzentration von 75 pg/ml, am Tag 6 68 pg/ml, Tag 8 56 pg/ml und an Tag 10 52 pg/ml gemessen werden. Ab Tag 12 konnte keine BMP-2-Expression mehr detektiert werden.

Im Überstand der Kontrollgruppe, in welcher die K-Drähte nur mit COPROGS, aber ohne Plasmide beschichtet waren, konnte zu keinem Zeitpunkt eine BMP-2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 14).

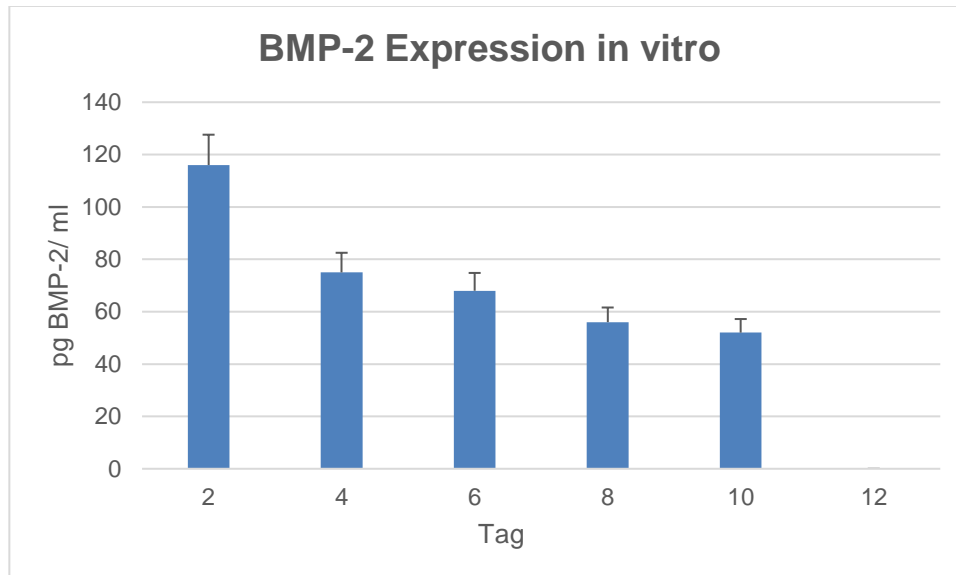


Abb. 14: In-vitro-Expression von COPROGS+BMP-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (COPROGS ohne DNA)

7.2 In-vivo-Tierversuch

7.2.1 Allgemeine Untersuchungsergebnisse

Alle Tiere belasteten ab dem ersten postoperativen Tag bereits die frakturierte Extremität. Am ersten Untersuchungstag nach 2 Wochen konnte eine Vollbelastung bei allen Tieren verzeichnet werden.

Sechs Tiere verstarben während der Narkose, wobei hier jeweils eine Unverträglichkeit der Narkosemittel vermutet wurde. Vier Tiere hatten einen lokalen Infekt an der operierten Extremität. Bei zwei dieser Tiere kam es infektbedingt zu Wanderung des Implantats. Bei zwei weiteren Tieren kam es zu einer Implantatwanderung ohne Infektzeichen. Somit konnten acht Tiere nicht in die Auswertung einbezogen werden. Ein Tier ist im Verlauf im Käfig verstorben. Der Grund dafür ist unklar geblieben. Bei 7 Tieren fiel am ersten Nachuntersuchungstag, welcher am 14. postoperativen Tag stattfand, ein Oberbauchabszess auf. Diese 7 Tiere wurden am selben Tag operiert und befanden sich in einer Gruppe. Das Abszessgeschehen hatte keine Auswirkungen auf die Untersuchungsergebnisse im Vergleich zu den anderen Tieren. Sie zeigten keine systemischen Infektzeichen, wie Fieber oder erhöhte Entzündungsparameter. Der

Befund war nach weiteren 14 Tagen komplett regredient. Da diese Tiere an einem Tag operiert wurden, wurde im Gespräch mit beteiligten Fachpersonen vermutet, dass die intraperitoneale Anästhesie falsch angewendet wurde.

Bei einem Tier zeigte sich nach der ersten Blutentnahme ein trübes Auge. Die Ratte schien objektiv damit keine Einschränkungen zu haben und wurde in die Auswertung einbezogen. Ein weiteres Tier wies eine 180°-Fehlstellung der operierten Extremität auf und wurde nicht in die Auswertung einbezogen.

7.2.2 Blutuntersuchungen, Gewicht und Temperatur

Am OP-Tag sowie an den jeweiligen Untersuchungstagen und am Tag der Tötung wurde den Tieren Blut abgenommen und die folgenden Parameter bestimmt: Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Glucose, alkalische Phosphatase, CRP, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, RDW, Thrombozyten und MPV. In keinen der angegebenen Parameter kam es zu signifikanten Unterschieden innerhalb der Gruppen. Insbesondere beim CRP, Hämoglobin und den Leukozytenwerten wurden keine Schwankungen verzeichnet. Die Ratten wurden mit einem Durchschnittsgewicht von $259,22 \text{ g} \pm 17,36 \text{ g}$ operiert. In der Leergruppe und der BMP-2-Gruppe kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des Körpergewichtes, was auch dem zunehmenden Alter der Tiere zuzuschreiben war. In der Tiergruppe, welche das allein mit COPROGs beschichtete Implantat erhielten, kam es am 1. Untersuchungstag zu einem durchschnittlich leichten Abfall des Körpergewichtes ($256,1 \text{ g} \pm 10,5 \text{ g}$ am Untersuchungstag zu $257,9 \text{ g} \pm 10,4 \text{ g}$ am OP-Tag), der jedoch nicht signifikant war. Am Ende des Untersuchungszeitraumes bestanden dann in allen 3 Gruppen annähernd die gleichen Körpergewichte. Die durchschnittliche Körpertemperatur lag am OP-Tag bei allen Tieren bei $36,9 \text{ °C} \pm 0,41 \text{ °C}$. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes kam es zu keiner signifikanten Temperaturänderung in den unterschiedlichen Gruppen (siehe Tab. 2).

	Gruppen	OP-Tag	Tag 14	Tag 28	Tag 42
Gewicht in g	Leer	253,6 ± 17,7	259,1 ± 18,2	263,5 ± 15,4	280,4 ± 15,4
	COPROGs	257,9 ± 10,4	256,1 ± 10,5	265,7 ± 10,4	281,2 ± 9,6
	BMP-2	259,4 ± 15,3	262,7 ± 18,8	278,6 ± 19,8	281,2 ± 20,2
Temperatur in °C	Leer	36,7 ± 0,3	36,9 ± 0,5	36,8 ± 0,4	37,2 ± 0,2
	COPROGs	36,8 ± 0,4	37,2 ± 0,5	37,2 ± 0,3	36,7 ± 0,5
	BMP-2	36,5 ± 0,5	37,0 ± 0,5	36,9 ± 0,4	37,1 ± 0,5

Tab. 2: Durchschnittliches Gewicht der Tiere und Körpertemperaturen

7.2.3 Röntgenauswertung der Tiere

Die radiologische Auswertung erfolgte als gemeinsame Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe und die Ergebnisse wurden teilweise bereits in anderen Dissertationen verwendet (216).

In der Gruppe, welche mit einem unbeschichteten K-Draht behandelt wurde und eine Standzeit von 28 Tagen hatte, zeigten zwei von 18 Tieren die Überbrückung von nur einer Kortikalis (Bewertung mit A) gemäß vorher festgelegtem Muster (siehe 3.10); 10 Tiere wurden mit einem B bewertet und 6 Tiere erhielten ein C. Nach einer Standzeit von 42 Tagen wurden in dieser Gruppe 2 Tiere von 19 mit einem A bewertet, 6 Tiere mit einem B und bei 11 Tieren war eine vollständige Konsolidierung – und somit ein C – festzustellen.

In der Gruppe mit COPROGs-beschichteten Nägeln und einer Standzeit von 28 Tagen wurde eins von 19 Tieren mit einem A bewertet, 17 Tiere mit einem B und ein Tier mit einem C. Nach einer Standzeit von 42 Tagen konnte bei keinem Tier von 18 bewerteten Tieren ein A vergeben werden, vier Tiere wurden mit einem B bewertet und bei 14 Tieren ließ sich eine vollständige Konsolidierung nachweisen.

Bei den Tieren, bei denen die osteosynthetische Versorgung mit einem BMP-2-Plasmid-beschichteten K-Draht vorgenommen wurde, wurde nach einer Standzeit von 28 Tagen eines von 19 Tieren mit A bewertet. 10 Tiere wurden mit B bewertet und 8 Tiere mit C. Nach einer Standzeit von 42 Tagen war bei keinem Tier keine Konsolidierung – und damit ein A – zu sehen. Bei sechs Tieren war eine unvollständige (1–3 Kortikalis-Überbrückungen) Konsolidierung zu beobachten und bei 12 Tieren war die Fraktur vollständig konsolidiert und diese Tiere erhielten somit ein C (Abb. 15).



Kontrollgruppe



COPROGs



COPROGs+
BMP-2

Abb. 15: Röntgenbilder nach 42 Tagen Standzeit der verschiedenen Gruppen (176)

A = 0 Überbrückungen



B = 1-3 Überbrückungen



C = 4 Überbrückungen



Abb. 16: Beispielbilder für die Ermittlung des Röntgenscores (Eigene Darstellung der Arbeitsgruppe)

Insgesamt lassen sich aus diesen Ergebnissen keine signifikanten Schlüsse auf die Beeinflussung der Frakturheilung ziehen (siehe Abb. 17 und 18).

Röntgenscore nach 28 Tagen Standzeit

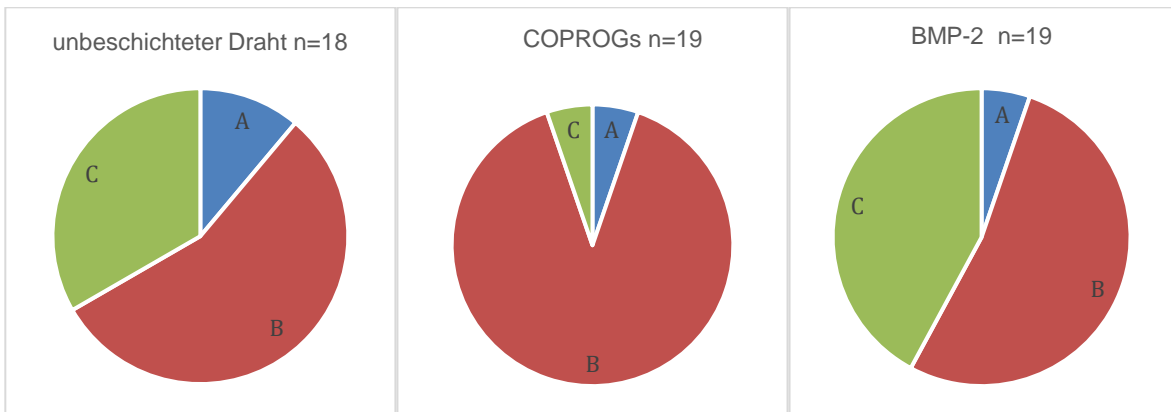


Abb. 17: Röntgenscore nach 28 Tagen Standzeit (A=0 Überbrückungen, B=1-3 Überbrückungen, C=4 Überbrückungen)

Röntgenscore nach 42 Tagen Standzeit

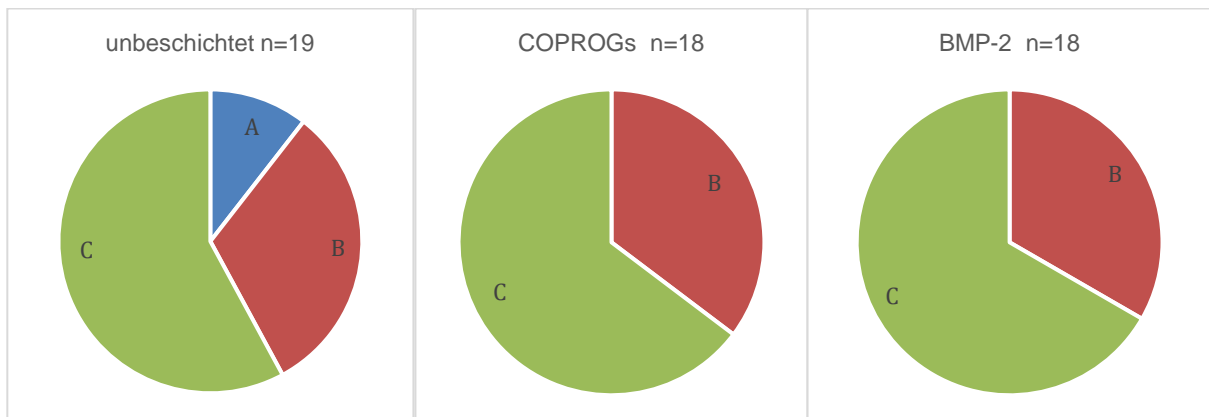


Abb. 18: Röntgenscore nach 42 Tagen Standzeit (A=0 Kortikalis-Überbrückungen, B=1-3 Kortikalis-Überbrückungen, C = 4 Kortikalis-Überbrückungen)

7.2.4 Biomechanische Auswertung

7.2.4.1 Maximales Drehmoment nach 28 Tagen Standzeit

Nach einer Standzeit von 28 Tagen zeigte sich in der Gruppe mit den COPROGs+BMP-2-beschichteten K-Drähten das höchste maximale Drehmoment (85,86 % ± 36,07 %), gefolgt von der Gruppe mit unbeschichteten K-Drähten (Kontrolle 73,17 % ± 26,16 %) und von der Gruppe mit PDLLA-Beschichtung (68,39 % ± 39,46 %). Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht verzeichnet werden (siehe Abb. 19).

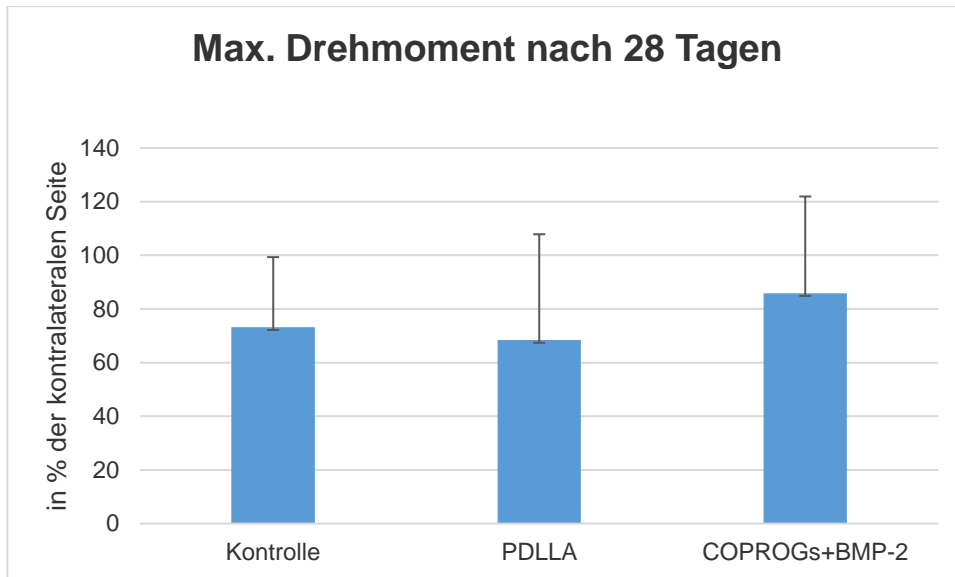


Abb. 19: Gegenüberstellung des maximalen Drehmoments zwischen den einzelnen Gruppen nach 28 Tagen

7.2.4.2 Torsionale Steifigkeit nach 28 Tagen Standzeit

Bei der Messung der torsionalen Steifigkeit nach 28 Tagen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Gruppe mit den PDLLA-beschichteten K-Drähten wies die höchste torsionale Steifigkeit auf (93,96 % ± 58,78 %). Danach folgte die Kontrollgruppe mit unbeschichteten Drähten (65,04 % ± 23,92 %), gefolgt von der Gruppe mit dem implizierten therapeutischen Gen, COPROG+BMP-2 (60,75 % ± 37,49 %) (siehe Abb. 20).

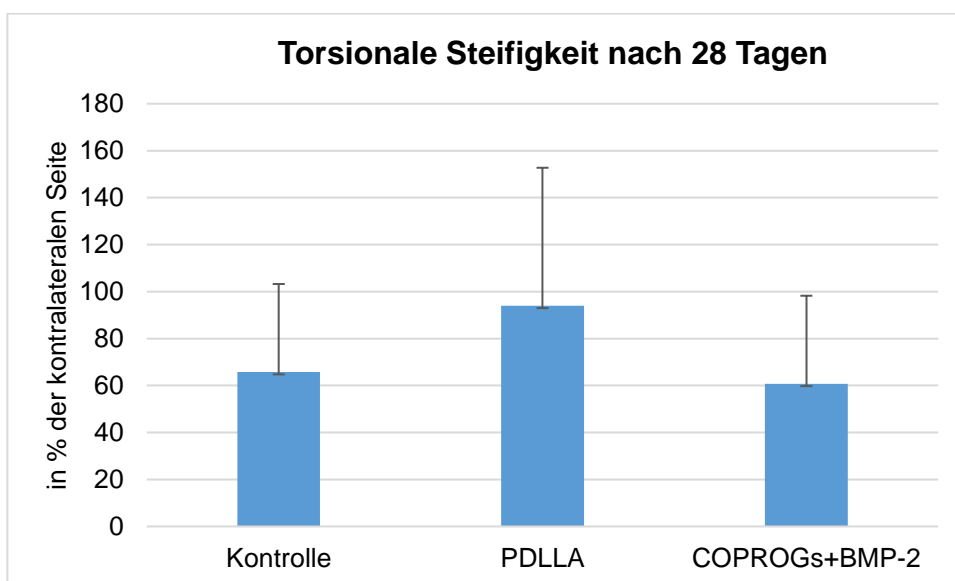


Abb. 20: Vergleich der torsionalen Steifigkeit zwischen den Gruppen nach 28 Tagen

Insgesamt blieben die biomechanischen Messwerte der frakturierten Seite nach 28 Tagen im Mittel in allen Gruppen bzgl. des maximalen Drehmoments und der torsionalen Steifigkeit unterhalb der Werte der kontralateralen intakten Tibia. Einzig in der COPROG-BMP-Gruppe wurde das maximale Drehmoment der unfrakturierten Seite erreicht.

7.2.4.3 Maximales Drehmoment nach 42 Tagen Standzeit

Die höchsten maximale Drehmoment-Werte nach einer Standzeit von 42 Tagen erreichten die Tiere in der COPROG-BMP-Gruppe (146,19 % ± 46,23 %). Diese Werte waren signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es folgte die Gruppe mit der PDLLA-Beschichtung (125,97 % ± 27,64 %) und danach die Kontrollgruppe (88,99 % ± 31,19 %) (siehe Abb. 21).

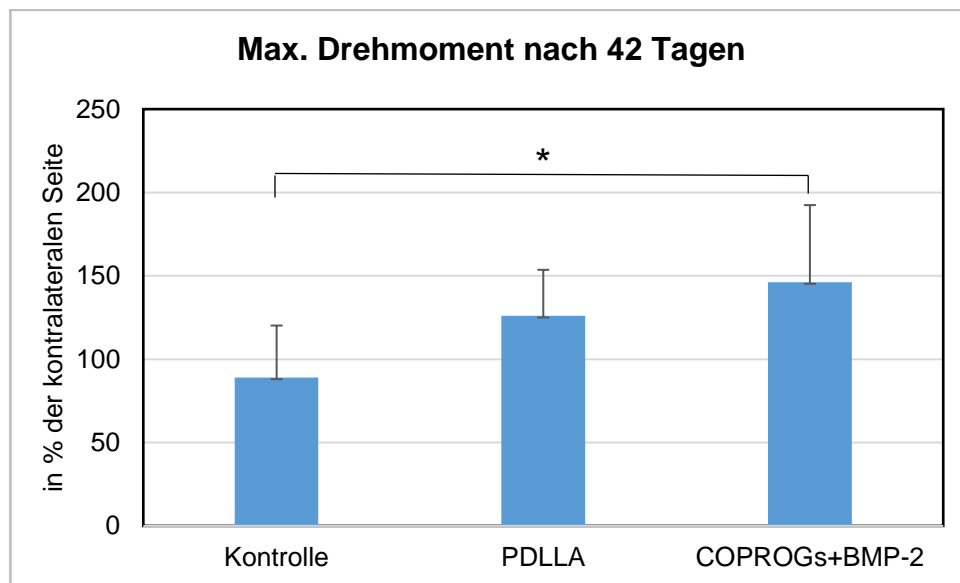


Abb. 21: Mittlere Werte des maximalen Drehmoments nach 42 Tagen; * $p < 0,005$ (ANOVA, Bonferroni)

7.2.4.4 Torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen

Wie bereits nach 28 Tagen lagen die Messwerte der einzelnen Gruppen bei der torsionalen Steifigkeit auch nach 42 Tagen eng beieinander.

Dabei wurden die höchsten Werte in der PDLLA-Gruppe gemessen (138,99 % ± 48,93 %). Danach folgten die Gruppe mit der COPROGs+BMP-2-Beschichtung (115,45 % ± 22,37 %) und die Kontrollgruppe (105,75 % ± 63,46 %) (siehe Abb. 22).

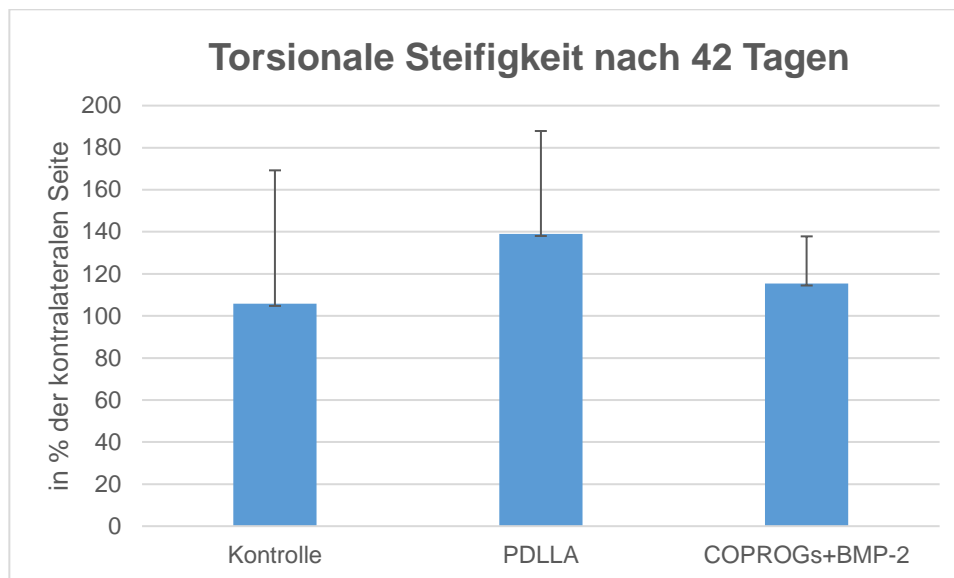


Abb.22: Mittlere Werte für die torsionale Steifigkeit nach 42 Tage

Bei beiden Messparametern, dem maximalen Drehmoment und der torsionalen Steifigkeit, wurden zum Zeitpunkt von 42 Tagen bei allen Gruppen die Werte jeweils der frakturierten Extremität die der unfrakturierten Extremität erreicht oder überschritten.

7.2.5 Histomorphometrische Auswertung (Nicht Teil dieser Promotion)

Die histomorphometrische Auswertung dieses Versuchs ist Bestandteil einer anderen Promotionsarbeit und soll hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

In der histomorphometrischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der Kallus sowohl nach 28 Tagen als auch nach 42 Tagen überwiegend aus Fibroblasten und Knorpelzellen bestand (Abb. 22). Keine der Gruppen zeigte eine vollständig konsolidierte Fraktur.

Zwischen den Gruppen gab es zu keinem der Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied, was die Morphologie der Kallusregion betraf.

Eine signifikant geringere Mineralisationszone im periostalen Kallus wurde nach 28 Tagen in der BMP-2-Gruppe gegenüber der Kontroll- und COPROGs-Gruppe nachgewiesen. Nach 42 Tagen konnte dies nicht mehr bestätigt werden.

In den anderen Parametern, welche gemessen wurden, wie dem mineralisierten Areal, dem periostalen Kallus-Areal und dem periostalen Knorpel-Areal, konnten keine Unterschiede gefunden werden (siehe Tab. 3 und 4).

	28 Tage		
	Kontrolle	COPROGs	COPROGs+BMP-2
Mineralisierter Areal/Kortex Areal	97,9 ± 1,32	97,4 ± 0,97	95,4 ± 1,86
Periostale Kallusregion (Ti.DM) (mm)	5,0 ± 0,88	5,2 ± 0,93	5,5 ± 1,86
Mineralisiertes Areal/periost. Kallus (%)	77,9 ± 6,36	71,4 ± 6,39	64,0 ± 11,18*
Knorpel Areal/periost. Kallus-Areal (%)	5,3 ± 4,18	9,6 ± 5,21	5,1 ± 3,59

Tab. 3: Histomorphometrische Analyse der Kallusregion der Tibia nach 28 Tagen

* signifikant geringere mineralisiertes Areal in der periostalen Kallus Zone bei der COPROG+BMP-2 Gruppe ($p < 0,005$ ANOVA, Bonferroni)

	42 Tage		
	Kontrolle	COPROGs	COPROGs+BMP-2
Mineralisierter Areal/Kortex Areal	97,2 ± 0,87	97,2 ± 0,92	97,1 ± 1,19
Periostale Kallusregion (Ti.DM)(mm)	5,0 ± 1,26	6,4 ± 1,78	6,8 ± 2,38
Mineralisiertes Areal/periost. Kallus (%)	79,4 ± 9,28	73,9 ± 9,31	71,0 ± 11,64
Knorpel Areal/periost. Kallus (%)	6,0 ± 4,54	6,3 ± 3,34	5,3 ± 4,65

Tab. 4: Histomorphometrische Analyse der Kallusregion der Tibia nach 42 Tagen

v. Kossa

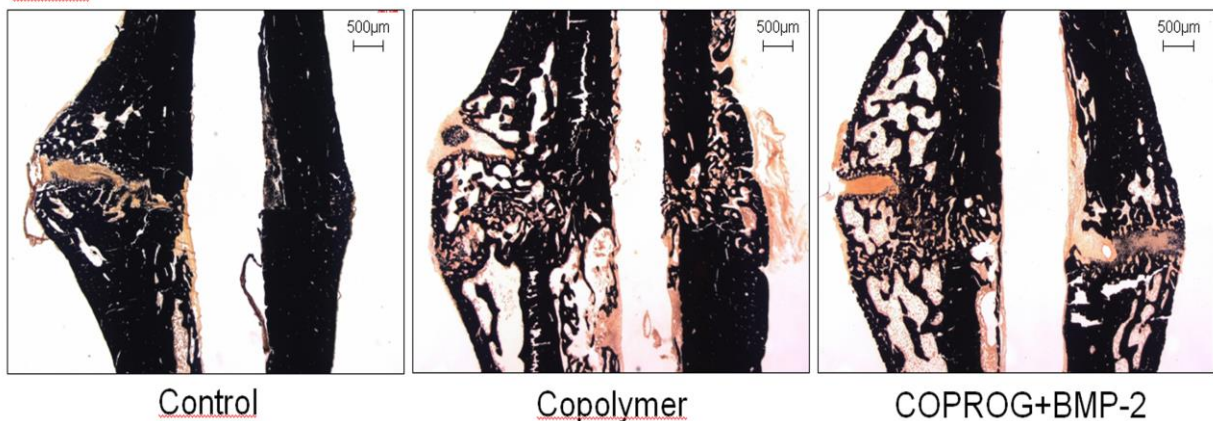


Abb. 23: Histologie der Kallusregion nach 42 Tagen in Von-Kossa-Färbung (176)

7.2.6 Auswertung der Luciferase-Expression (Nicht Teil dieser Promotion)

Die Luciferasebestimmung in der PCR als Nachweis oder Ausschluss einer systemischen Transfektion in diesem Versuch ist Bestandteil einer anderen Arbeit und wird hier nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

An Tag 2, Tag 4, Tag 7, Tag 28 und Tag 42 wurden die getesteten Tiere, welche das Markergen Luciferase auf dem K-Draht implantiert bekamen, getötet und Proben von Gehirn, Lungen, Leber, Milz, Nieren, Muskeln und der frakturierten Knochen analysiert. In allen Knochenproben konnte per PCR zu jedem gemessenen Zeitpunkt Luciferase nachgewiesen werden. Dagegen wurde in keinem Organ Luciferase nachgewiesen. In einer semiquantitativen PCR-Analyse wurde die Transfektionsrate in den einzelnen Knochenproben bestimmt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die höchste Transfektion zu den früheren Zeitpunkten stattfand (Tag 2, 4 und 7). Am Tag 28 und 42 konnten nur noch geringe Mengen an Luciferase gemessen werden (Abb. 24).

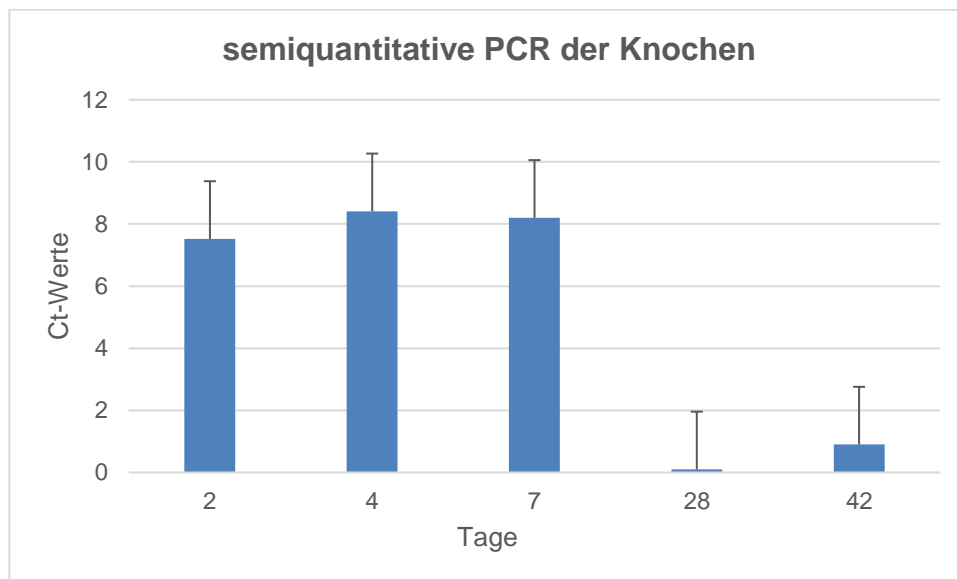


Abb. 24: Semiquantitative PCR-Ergebnisse der Transfektion von Luciferase in den einzelnen Knochenproben

8 Diskussion

Trotz steigender Vorsichtsmaßnahmen und gesellschaftlicher Initiativen sind Frakturen und ihre operative Versorgungsnotwendigkeit noch immer häufig (177). In Fällen einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung (178) kommt es oft zu zusätzlichen Operationen, Krankenhausaufenthalten, Arbeitsausfällen und Gesundheitskosten (5, 178, 179). Deshalb wird seit einigen Jahren eine gesteigerte Konzentration auf eine Optimierung der Frakturheilung gelegt, unter anderem auch durch die Erforschung der Verwendung von Wachstumsfaktoren. Da die bislang zugelassenen rekombinanten Wachstumsfaktoren jedoch einige Nachteile mit sich bringen, sollte in der vorliegenden Dissertation ein gentherapeutischer Ansatz untersucht werden.

Hierzu wurde in einem in-vivo-Rattenmodell der Einfluss des neu entwickelten non-viralen Vektors COPROG auf die Frakturheilung getestet. Nach Setzen einer Unterschenkelfraktur (170) erfolgte eine Stabilisierung der Tibia mit K-Drähten, die mit PDLLA-COPROGs ohne Plasmid (COPROGs-Gruppe), PDLLA-COPROGs-BMP-2-Plasmid (BMP-2-Gruppe) beschichtet oder unbeschichtet (Leergruppe) waren. Nach 28 bzw. 42 Tagen wurden die Tiere getötet, beide Tibiae entnommen und biomechanisch das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit bestimmt. Weitere Bestandteile der Gesamtstudie – jedoch Inhalte anderer Disserationsarbeiten - waren die histomorphometrische Auswertung zu den gleichen Zeitpunkten und die Messung von Luciferase-Aktivität in verschiedenen Organen der Tiere nach 2, 4, 7, 28 und 42 Tagen, um eine unerwünschte systemische Transfektion nachzuweisen. Diese werden im Folgenden nur zur Kontextstiftung erwähnt.

8.1 Diskussion der biomechanischen Ergebnisse

Nach einer Standzeit von 28 Tagen wurden die höchsten Werte für das maximale Drehmoment in der BMP-2-Gruppe gemessen, gefolgt von der Leergruppe. Die geringsten Werte wurden in der COPROGs-Gruppe bestimmt. Bei der torsionalen Steifigkeit wurden die höchsten Werte in der COPROGs-Gruppe gemessen, gefolgt von der BMP-2-Gruppe und danach der Leergruppe. Insgesamt blieben die gemessenen Werte nach einer Standzeit von 28 Tagen sowohl beim maximalen Drehmoment als auch bei der torsionalen Steifigkeit in der COPROGs- und Leergruppe unter den Werten der kontralateralen Seite. Einzig in der BMP-2-Gruppe erreichten die Werte des maximalen Drehmoments der frakturierten Seite die der unfrakturierten Seite. Grund dafür könnte

die noch zu kurze Standzeit gewesen sein, mit nach 28 Tagen noch nicht ausreichend durchbauter Fraktur.

Nach 42 Tagen wurde der höchste Wert des maximalen Drehmoments in der BMP-2-Gruppe gemessen. Diese Werte waren statistisch signifikant gegenüber der Leergruppe. Bei der Messung der torsionalen Steifigkeit wurden auch hier die höchsten Werte in der Gruppe der BMP-2-beschichteten K-Drähte gemessen, gefolgt von der COPROGs-Gruppe und der Leergruppe, allerdings ohne signifikante Unterschiede. Bei beiden Messparametern überstiegen sowohl in der COPROGs-Gruppe, als auch in der BMP-2-Gruppe die Werte der frakturierten Seite die der unfrakturierten kontralateralen Seite. Die biomechanischen Ergebnisse dieser Studie lassen somit keine eindeutige Schlussfolgerung hinsichtlich der Wirksamkeit der verwendeten BMP-2-Plasmid-Beschichtung zu.

Entgegen der hier vorliegenden Ergebnisse konnten andere Studien signifikante Verbesserungen der biomechanischen Stabilität von verletzten Knochen unter BMP-2-Einfluss bereits nach 4 Wochen (79, 180), aber auch nach 8 (181) und 12 Wochen (182) zeigen. Gleichzeitig gab es auch Arbeiten, deren biomechanische Ergebnisse den hier ermittelten ähnelten. So zeigte eine Studie an Osteotomiedefekten bei Rattenfemora, bei welcher den Tieren Hydroxylapatit/Kollagen-Matrices u. a. mit rekombinantem BMP-2 implantiert wurden, dass bei der biomechanischen Untersuchung mittels 3-Punkt-Biegetest nach 8 Wochen die Werte der osteotomierten Seite in der BMP-2-Gruppe annähernd die der kontralateralen Seite erreichten (183).

Als interessanter Vergleich kann auch eine andere Studie der Arbeitsgruppe dieses Promotionsprojekts dienen, bei der unter rekombinantem BMP-2-Einfluss bei direkter Einbettung in eine PDLLA-Beschichtung signifikant höhere maximale Drehmomente und Torsionssteifigkeiten gemessen wurden (79). Bei gleichem Studienaufbau könnten die in der vorliegenden Arbeit uneindeutigen biomechanischen Ergebnisse auf den Genvektor zurückzuführen sein. Interessanterweise war der absolute Wert des maximalen Drehmoments nach 42 Tagen Standzeit in der vorliegenden COPROG-BMP-2-Gruppe höher als in der rhBMP-2-Gruppe der vorangegangenen Studie, wohingegen die anderen biomechanischen Ergebnisse in der vorliegenden Studie die Ergebnisse nicht unterstützen. Der Grund dafür bleibt unklar, zumal davon auszugehen ist, dass es zu einer Transgen-Expression gekommen war, was anhand des Luciferase-Nachweises bewiesen wurde (Teil einer anderen Dissertation).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der lokalen Applikation einer für BMP-2 kodierten cDNA durch einen adenoviralen Vektor auf die Knochenheilung eines Defektmodells an Rattenfemurknochen untersucht. Dabei wurde jedoch die lokale Applikation zeitlich verzögert zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen. Die besten biomechanischen Ergebnisse wurden an den Injektionstagen 5 und 10 erzielt (184). Die zeitlich verzögerte Applikation nach Defektsetzung wäre jedoch in dem hier verwendeten Modell nicht umsetzbar, da die untersuchte DNA jeweils bereits in der Beschichtung des K-Drahtes integriert worden war.

8.2 Diskussion des Vektors

Wachstumsfaktoren werden bereits seit vielen Jahren bei der Unterstützung der Frakturheilung klinisch angewendet. BMP-2 ist in rekombinanter Form für die klinische Anwendung bei offenen Tibiafrakturen zugelassen (185) und konnte u. a. in der BESTT-Studie („BMP-2-Evaluation in Surgery for Tibia Trauma“) die Frakturheilung bei drittgradig offenen Tibiafrakturen signifikant beschleunigen (99). Da Wachstumsfaktoren in rekombinanter Form eine kurze Halbwertszeit besitzen (186) wurden experimentell für eine biologische Antwort teils deutlich supraphysiologische BMP-2-Dosierungen angewendet, was lokale und systemische Nebenwirkungen bedingen könnte (185). Um diese zu umgehen, wäre die Gentherapie ein möglicher Ansatz, bei der Proteine vom Körper selbst synthetisiert werden und über einem definierten Zeitraum in einer definierten Menge an einem definierten Ort wirken würden.

In der vorliegenden Studie wurde ein neu entwickelter non-viraler Genvektor basierend auf einem Polymer-umhüllten Plasmid (COPROG) verwendet (152). In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass COPROGs sowohl in vitro als auch in-vivo in der Lage sind, über einem bestimmten Zeitraum ein Protein, das Reporter-gen Luciferase, zu exprimieren (187, 188). So konnte in-vivo nach subkutaner Implantation eines Kollagenschwammes eine kontinuierliche und suffiziente Expression von Luciferase unter COPROGs-Einfluss nachgewiesen werden (188).

In der vorliegenden Dissertation wurde zusätzlich nachgewiesen, dass COPROGs im Vergleich zu nackter DNA über einem Zeitraum von mindestens 10 Tagen kontinuierlich BMP-2-Plasmid exprimieren und somit die Synthese des Wachstumsfaktors erfolgen könnte. In der in-vitro Gruppe von Rattenosteoblasten von mit nackter DNA beschichteten K-Drähten konnte zu keinem Zeitpunkt BMP-2 nachgewiesen werden. Ein In-vivo-

Hinweis, dass eine Transfektion durch COPROGs stattfindet, wurde durch den Nachweis von Luciferase im Knochen erbracht, als Teil einer anderen Dissertation dieses Gesamtprojekts.

Auch andere Studien konnten bereits adenovirale Vektoren mit BMP-2-kodierender DNA im Rahmen von Critical-Size-Defekten an Rattenfemora zur Transduktion von Knochenmarkzellen nutzen und eine höhergradige Qualität von neugebildetem Knochen im Vergleich zu rekombinantem BMP-2 erreichen (189), bzw. teils auch signifikant höhere Konsolidierungsraten durch den Einsatz von solchen Vektoren verzeichnen, verglichen mit BMP-2-freien Vergleichsgruppen (190).

Angesichts von aber noch beschriebenen Problemen bei der Verwendung viraler Vektoren, der immunogenen Wirkung oder einer Integration in das Genom von Zielzellen (118), kann bislang der therapeutische Benefit einer Gentherapie im Kontext der Frakturheilung nicht verlässlich abgeschätzt werden. Es ist davon auszugehen, dass jedes Individuum unterschiedlich auf die Transgen-Expression reagiert. Das Hauptproblem besteht nach wie vor darin, die Art und Länge der Plasmid-Übertragung zu identifizieren, um einerseits die Frakturheilung positiv zu unterstützen, aber andererseits negative systemische Reaktionen zu vermeiden.

8.3 Diskussion der Dosierung

In der vorliegenden Studie wurde 40 µg Plasmid-DNA verwendet, um einen Effekt zu erzielen. Die in-vitro Ergebnisse zeigten, dass es mit der gleichen Menge DNA zur Transfektion kam. Im vorliegenden Versuch wurde zusätzlich per PCR nachgewiesen, dass es bis zu 42 Tage zu einer Transgen-Expression von BMP-2 kommt. Doch schien die Plasmid-DNA-Menge nicht ausgereicht zu haben, um die Frakturheilung signifikant zu beschleunigen. Im Vergleich zu anderen Studien wurde im vorliegenden Versuch weitaus weniger Plasmid-DNA verwendet (123, 184, 191-193). So finden sich in der Literatur Hinweise auf sehr unterschiedliche Ansätze bzgl. der Dosen, welche benutzt wurden. Beispielsweise erzielten Dosen zwischen 0,5 mg und 1 mg BMP-4-kodierte Plasmid-DNA positive Effekte mit vollständiger Überbrückung von kritischen Knochendefekten an Rattenfemora (191). In anderen Studien wiederum konnten Dosen von bis zu 100 mg PTH-kodierte Plasmid-DNA am Hundemodell keine vollständige Konsolidierung der Defektzone nach 6 Wochen bewirken (123). Allerdings kann im letzteren

Fall PTH nicht mit BMP verglichen werden und ein Hundemodell bedarf anzunehmend weitaus höherer therapeutischer Dosen als ein Rattenmodell.

Bei der Verwendung von rekombinanten BMP-7-Proteinen an kritischen Defekten an Rattenknochen führten 100 µg Proteine zur schnellsten und besten Überbrückung der gesetzten Defekte im Gegensatz zu 25 µg, 50 µg und 75 µg; dabei kam es in der Gruppe mit der niedrigsten Dosierung zu keiner Überbrückung im Testzeitraum (192). Allerdings wurden in diesem Versuchsaufbau rekombinante Proteine benutzt und die Dosis der Plasmid-DNA war sicherlich nicht der Dosis der Proteine gleichzusetzen.

Im Bereich der Gentherapie mit einem viralen Vektor werden in der Literatur Dosis-mengen in Partikeln angegeben. In einer Studie mit einem adenoviralen Vektor und BMP-2-Plasmid an einem Defektmodell am Rattenfemur wurden $2,7 \times 10^7$, $2,7 \times 10^8$ und $2,7 \times 10^9$ Partikel subcutan in die Läsion einmalig injiziert. Der gesetzte Defekt war in der Gruppe mit der höchsten Dosis signifikant besser überbrückt (193).

Insgesamt lässt sich folgern, dass höhere Dosen in den meisten Studien die besseren Ergebnisse erbrachten. Schlussendlich bedeutet dies, dass weitere Versuche mit verschiedenen Dosierungen angestrebt werden könnten, um die geeignete Dosis herauszufinden. Zudem scheint auch der Applikationszeitpunkt eine Rolle zu spielen. In einem Versuch mit 4×10^8 Partikeln eines adenoviralen Vektors und BMP-2-Plasmid wurde die gleiche Dosis am Ratten- und Kaninchenmodell einmalig intraperitoneal an verschiedenen Zeitpunkten nach initialer Critical-Size-Defektsetzung am Femur appliziert. An den Tagen 5 und 10 nach Trauma heilten die Defekte, im Gegensatz zur Applikation am OP-Tag und Tag 1, im Nachhinein am besten (184). Wie dies unter anderem durch die Beschichtungsart von Implantaten im vorliegenden Aufbau adressiert werden könnte, soll nun im Folgenden diskutiert werden.

8.4 Diskussion der Beschichtung

Im vorliegenden Versuchsaufbau war eine zeitlich verzögerte Abgabe der Plasmide aufgrund der Konfiguration der gewählten Beschichtung nicht möglich. Es konnte aber für PDLLA gezeigt werden, dass das Freisetzungsprofil von Substanzen durch eine Modifikation der Beschichtungsbestandteile verändert werden kann (194). Somit ist perspektivisch auch eine zeitlich verlängerte Abgabe von therapeutischen Genen denkbar. Allgemeine Anforderungen für Systeme zur lokalen Freisetzung von Wachstumsfaktoren beinhalten, dass sie die Wirkung der jeweiligen Wachstumsfaktoren

erhalten und nach Möglichkeit resorbierbar sein sollten (194). Die Wachstumsfaktoren sollten hingegen langsam und kontinuierlich freigesetzt werden und dies über einen definierbaren Zeitraum.

Bei der Frakturheilung wurde die Gabe von Wachstumsfaktoren experimentell auf verschiedene Art und Weise untersucht. So zeigte sich in einem Rattenfrakturmodell, dass eine einzige perkutane Injektion von rekombinanten BMP-2 die Frakturheilung maßgeblich verbessern kann (80). Neben der Gefahr der Infektion könnten Injektionen, welche erst postoperativ angewandt werden, den Frakturheilungsverlauf auch negativ beeinflussen oder bei Fehlplatzierung von BMP zu heterotropen Ossifikationen führen. Eine andere Applikationsmethode sind Carrier-Systeme, die idealer Weise einen Knochendefekt überbrücken können, biomechanisch widerstandsfähig sind und eine verzögerte Abgabe enthaltener Wirkstoffe ermöglichen (195). So wurde Kollagen als Träger für Wachstumsfaktoren gründlich untersucht (196-199). Obwohl es bislang der einzige Carrier ist, welcher bei der FDA für BMPs zugelassen wurde, stellen Kollagenschwämme für die verzögerte Abgabe von Wachstumsfaktoren noch eine untergeordnete Rolle dar (200). Die in diesem Versuchsaufbau verwendete PDLLA-Beschichtung ist eine Technik, die knochenaktive Substanzen direkt am Ort des Interesses freisetzen kann (158). Über eine kalte Beschichtungstechnik können auch thermisch empfindliche Wirkstoffe ohne Denaturierung verwendet werden. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Beschichtung bei Implantateinbringung zu ca. 96 % standhält und erst im Laufe mehrerer Wochen vollständig vom Körper abgebaut wird (158). Neben der zu Beginn dieses Kapitels erwähnten Modifikationsmöglichkeit des Freisetzungsprofils von eingearbeiteten Substanzen in PDLLA wurden in anderen Studien bereits die Einarbeitung von anderen Arzneimitteln, wie z. B. Simvastatin oder Zolendronat, getestet, wobei durchaus überzeugende Resultate erzielt wurden (164, 201).

8.5 Diskussion des Tiermodells

Die komplexen multifaktoriellen pathophysiologischen Abläufe der Frakturheilung sind immer noch schwer in einem in-vitro-Modell untersuchbar und bedürfen deshalb oftmals immer noch eines in-vivo-Tiermodells. Die Wahl der jeweiligen Tierspezies ist jedoch abhängig von Indikation und auch Stadium der experimentellen Testung. Kleintiermodelle haben dabei gegenüber Großtiermodellen logistische und finanzielle Vorteile (121). Die Arbeitsgruppe, aus der heraus diese Promotionsarbeit entstanden ist, konnte mit durch

sie entwickelte standardisierte Rattenmodelle auf eine lange Erfahrung im Umgang mit dieser Spezies zurückgreifen, was gleichzeitig eine gute Vergleichbarkeit der Versuche erlaubte (170, 180, 202, 203). Im Vergleich zu Menschen haben Ratten zwar ein höheres Stoffwechsellniveau und größenbedingt eine völlig andere mechanische Belastung der Extremitäten, allerdings wird berichtet, dass der Knochenstoffwechsel hohe Übereinstimmungen mit dem des Menschen zeigt (204). Damit erscheint das Rattenmodell geeignet, knöcherne Untersuchungen mit humanen Implikationen durchführen zu können. Zusätzlich erlaubt die geringe Körpergröße eine relativ hohe Zahl an Versuchstieren mit geringem Haltungsaufwand (121). Die Narkoseführung ist einfach und man kann – bei einem vergleichsweise einfachen Operationsverfahren – an einem Tag eine größere Anzahl an Tieren operieren. Daraus resultierten ein kürzerer Versuchszeitraum und eine bessere Vergleichbarkeit der Tiere, da sie sich alle im ungefähr gleichen Alter befinden. Auf dem Gebiet der Forschung bezüglich der positiven Beeinflussung der Knochenheilung durch die Gentherapie wurde am häufigsten und erfolgreichsten ein Kleintiermodell, wie die Ratte oder das Kaninchen, gewählt (189). Hingegen gibt es dazu wenige Großtiermodellstudien, welche jedoch im Vorfeld zu klinischen humanen Studien benötigt würden (189). Gentherapeutische Ansätze mit Adenoviren wurden erfolgreich am Ziegen-, Schwein- und Pferdmodell mit Knochendefekten an Langknochen, Schädelknochen und zur Untersuchung der Osteonekrose am Beckenknochen untersucht (205-207). Untersuchungen per direkter Injektion BMP-kodierter DNA mittels adenoviraler Vektoren waren am Kleintiermodell, wie Ratte oder Kaninchen, vielversprechend (193, 208, 209), jedoch am Schafmodell unwirksam (125). Grund dafür könnte eine Immunreaktion auf den Vektor gewesen sein oder die Unwirksamkeit des humanen BMP beim Schaf (210). Somit sollte die Wahl eines passenden Tiermodells speziell im Kontext der in dieser Dissertationsarbeit behandelnden Fragestellung in Zukunft weiterhin kritisch geprüft werden.

8.6 Diskussion des Frakturmodells

Um die Knochenheilung in vivo zu beforschen, muss im Vorfeld eine Fraktur oder Osteotomie gesetzt werden. Um speziell eine Situation mit Frakturheilung ausreichend vergleichbar zu machen, wird eine standardisierte Ausgangssituation benötigt. Diese beinhaltet einen standardisierten Frakturmechanismus mit einer entsprechend im Ergebnis reproduzierbaren Fraktur, dem dazugehörigen Weichteilschaden, aber auch

eine einheitliche anschließende osteosynthetische Versorgung. Die ersten experimentellen Frakturen an Tieren wurden manuell gesetzt – ohne feste Standardisierung (211). Modelle mit Standardisierung umfassten später Osteotomien (212, 213) oder das Setzen einer Sollbruchstelle mit einer Säge oder einem Bohrer, um dann den betreffenden Knochen nach Manipulation zu frakturieren (214, 215). Diese Modelle konnten zwar reproduzierbare Knochenläsionen hervorrufen, waren jedoch nicht nah genug an den realen Pathomechanismen einer traumatischen Frakturgenese orientiert.

Bei einer weiteren Methode wurden zwar durch eine 3-Punkt-Biegung standardisierte Frakturen geschaffen (216), jedoch bei vorher eingebrachten intramedullären Marknägeln, was ebenfalls nicht dem pathophysiologischen Vorgang von Hochrasanztraumata entsprach und zusätzlich zu Verformungen des Osteosynthesematerials führen konnte. Durch die Arbeitsgruppe der vorliegenden Studie konnte diese Methode weiterentwickelt werden, indem mit einem Guillotine-Verfahren am intakten Unterschenkel einer narkotisierten Ratte ein realitätsnahes Trauma mit konsekutiver standardisierter Unterschenkelfraktur gesetzt wurde (170). Erst im Anschluss wurde dann diese Fraktur durch anterograde Eröffnung des Markkanals mittels K-Draht osteosynthetisch versorgt. Dieses Verfahren ist auch beim Menschen eine etablierte Methode zur Versorgung von Tibiaschaftfrakturen und kann somit gut argumentativ vom Kleintier auf den Menschen übertragen werden. Zudem ist eine Eröffnung der Fraktur nicht nötig und eine damit verbundene Weichteilverletzung und Infektionsgefahr limitiert.

8.7 Ausblick

Das Verständnis von den Abläufen der Frakturheilung hat, auf Grund verschiedener Forschungsvorhaben in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte gemacht (217). Im Rahmen experimenteller Studien für biologische Therapiemöglichkeiten spielen Wachstumsfaktoren eine weiterhin relevante Rolle.

Neben dem in dieser Promotionsarbeit mit erforschtem BMP-2, wird dabei auch dem *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) vor allem in der frühen Phase der Knochenheilung eine entscheidende Rolle in der Osteogenese zugeschrieben (218-220). Er konnte bereits in klinischen Studien durch lokale Injektion in den Frakturbereich eine verbesserte Frakturheilung erzielen (221). Die kombinierte Applikation von BMP-2 und FGF-2 (Q)

konnte experimentell die beste Frakturkonsolidierung gegenüber alleiniger Gabe der Wachstumsfaktoren erzielen (222). Auch der Einsatz von Plasmiden zeigte eine positive Wirkung mit einer signifikanten Verbesserung der Heilung von Knochendefekten durch PEI-, BMP-2- und FGF-2-Plasmide (223).

Andere Wachstumsfaktoren, wie der *platelet-derived growth factor* (PDGF) mit seiner Beeinflussung der Angiogenese fördern ebenfalls die Frakturheilung (59, 224) und haben teils auch schon klinische Zulassungen erhalten (u. a. von der FDA in den USA für Augment® Bone-Graft, Fa. Wright Medical; PDGF-BB mit einem Tricalcium-Phosphat Gerüst) (225). Weitere Forschungsansätze konzentrieren sich auf eine Analyse der Zusammensetzung des Frakturhämatoms, welches die nachfolgende Knochenreparatur steuert. Hierbei soll die Knochenheilung durch die Migration mesenchymaler Stromazellen unterstützt und beschleunigt werden (226). In dem Kontext der komplexen multifaktoriellen und zeitlich unterschiedlichen Phasen der Frakturheilung sollte auch die Verwendung von Plasmiden für eine ggf. auch kombinierte Einbringung und sequenzielle Aktivierung von relevanten Wachstumsfaktoren weiter erforscht werden. Ein Goldstandard in der Therapie von Frakturen wurde jedoch noch nicht gefunden, sodass die Identifizierung der bestmöglichen Behandlungsstrategien noch weiter vorangetrieben und erforscht werden muss.

8.8 Zusammenfassung

Die Regeneration des Knochens nach stattgehabter Fraktur ist ein komplexer und gut koordinierter Prozess, welcher jedoch lebenslangen Umwandlungsprozessen unterlegen ist (227). Aktuell existiert eine Vielzahl an Ansätzen um den gestörten Knochenregenerationsprozess zu unterstützen. Darunter zählen unter anderem die Anwendung von autologer Spongiosaplastik als Goldstandard (36, 37), allogene Knochentransplantate (43), osteokonduktive, synthetische oder natürliche Biomaterialien (46), biophysikalische Methoden (47, 48, 49, 50) oder die Anwendung von Wachstumsfaktoren (59, 60). Das verbesserte Verständnis der molekularen und zellulären Vorgänge während der Knochenheilung, führte zur Entwicklung von einer Reihe von Wirkstoffen, welche die Knochenregeneration verbessern können (227). Dabei wurde ein Focus auf die Wachstumsfaktoren gelegt. Vor allem die Faktoren der TGF- β Familie, worunter auch das BMP-2- zählt, wird eine Schlüsselrolle in der Knochenheilung zugesprochen. Doch existiert eine Vielzahl an Studien mit den unterschiedlichsten

Ansätzen, so dass diese schwer untereinander vergleichbar sind. Das Fehlen standardisierter Ergebnismessungen für den Vergleich von biologischen Wirkstoffen in Frakturheilungsstudien bei häufigem Off-Label-Anwendungen und dem nach wie vor begrenzten Verständnis der Wirksamkeit der einzelnen biologischen Wirkstoffe, schränken die Anwendung im klinischen Bereich merklich ein (227). Womöglich bedarf es einer Kombination aus vielen Regenerationsstrategien um den gewünschten Effekt zu erzielen. Dieses Konzept sollte dann im klinischen Alltag gut anwendbar und bezahlbar sein.

9 Literaturverzeichnis

1. Delmas PD, Anderson M. Launch of the bone and joint decade 2000-2010. *Osteoporos Int.* 2000;11(2):95-7.
2. Dreinhöfer K. Bone and Joint Decade 2000-2010: Prävention und Management effizienter gestalten. *Dtsch Ärztebl.* 2000;97(51-52):A-3478/B-2923/C-601. German.
3. Meisinger C, Wildner M, Stieber J, Heier M, Sangha O, Doring A. Epidemiologie der Extremitätenfrakturen. *Orthopäde.* 2002;31(1):92-9. German.
4. Marsell R, Einhorn TA. Emerging bone healing therapies. *J Orthop Trauma.* 2010;24 Suppl 1:4-8.
5. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(6):940-56.
6. Einhorn TA, Lane JM. Significant advances have been made in the way surgeons treat fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S2-3.
7. Green E, Lubahn JD, Evans J. Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *J Surg Orthop Adv.* 2005;14(2):64-72.
8. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch.* 257th ed. Berlin, New York: De Gruyter; 1994. German.
9. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-5.
10. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978;60-B(2):150-62.
11. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1215-28.
12. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.

13. Pivonka P, Dunstan CR. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. *Bonekey Rep.* 2012;1:221.
14. LaStayo PC, Winters KM, Hardy M. Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. *J Hand Ther.* 2003;16(2):81-93.
15. Haverstock BD, Mandracchia VJ. Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg.* 1998;37(1):69-74; discussion 8.
16. 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(2):107-18.
17. Pilitsis JG, Lucas DR, Rengachary SS. Bone healing and spinal fusion. *Neurosurg Focus.* 2002;13(6):e1.
18. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol.* 2008;251(1):137-58.
19. Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. *Bone.* 2009;45(2):254-66.
20. Goldhahn J, Feron JM, Kanis J, Papapoulos S, Reginster JY, Rizzoli R, Dere W, Mitlak B, Tsouderos Y, Boonen S. Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: an ESCEO consensus paper. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(5):343-53.
21. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38(12):1424-9.
22. Puzas JE, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Zhang X. Pharmacologic modulators of fracture healing: the role of cyclooxygenase inhibition. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003;3(4):308-12; discussion 20-1.

23. Oestern H, Düring M. Traumatologie. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003. German.
24. Weber B, Cech O. Pseudarthrosis: Pathology, biomechanics, therapy, results. Bern: Hans Huber Medical; 1976.
25. Puranen J, Kivinitty K, Kaski P. Strontium-85 profile counting in fractures of the tibial shaft. *Acta Orthop Scand*. 1975;46(4):569-78.
26. Thein E, Chevalley F, Borens O. Pseudarthroses aseptiques des os longs. *Rev Med Suisse*. 2013;9(411):2390-6. French.
27. Frölke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury*. 2007;38 Suppl 2:S19-22.
28. Jones CB, Mayo KA. Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma*. 2005;19(10 Suppl):S11-3.
29. Mathavan N, Bosemark P, Isaksson H, Tagil M. Investigating the synergistic efficacy of BMP-7 and zoledronate on bone allografts using an open rat osteotomy model. *Bone*. 2013;56(2):440-8.
30. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S3-15.
31. Brinker MR, Hanus BD, Sen M, O'Connor DP. The devastating effects of tibial nonunion on health-related quality of life. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(24):2170-6.
32. Sen C, Eralp L, Gunes T, Erdem M, Ozden VE, Kocaoglu M. An alternative method for the treatment of nonunion of the tibia with bone loss. *J Bone Joint Surg Br*. 2006;88(6):783-9.
33. Papineau LJ, Alfageme A, Dalcourt JP, Pilon L. Ostéomyélite chronique: excision et greffe de spongieux à l'air libre après mises à plat extensives. *Int Orthop*. 1979;3(3):165-76. French.

34. Gordon L, Chiu EJ. Treatment of infected non-unions and segmental defects of the tibia with staged microvascular muscle transplantation and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(3):377-86.
35. Tu YK, Yen CY, Yeh WL, Wang IC, Wang KC, Ueng WN. Reconstruction of posttraumatic long bone defect with free vascularized bone graft: good outcome in 48 patients with 6 years' follow-up. *Acta Orthop Scand.* 2001;72(4):359-64.
36. Aronson J. Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79(8):1243-58.
37. Green SA, Jackson JM, Wall DM, Marinow H, Ishkanian J. Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport method. *Clin Orthop Relat Res.* 1992(280):136-42.
38. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000(371):10-27.
39. Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury.* 2009;40(11):1231-6.
40. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(5):716-20.
41. St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, Hilibrand A. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2003;32(1):18-23.
42. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-5.
43. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9:66.
44. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64.

45. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
46. Urist MR. Bone Transplants and Implants. In: Urist MR, editor. *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott; 1980. p. 331-68.
47. Pounder NM, Harrison AJ. Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. *Ultrasonics*. 2008;48(4):330-8.
48. Griffin XL, Costello I, Costa ML. The role of low intensity pulsed ultrasound therapy in the management of acute fractures: a systematic review. *J Trauma*. 2008;65(6):1446-52.
49. Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M. Electrical stimulation for long-bone fracture-healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(11):2322-30.
50. Gollwitzer H, Gloeck T, Brandner H. Die Extrakorporale Stoßwellentherapie zur Behandlung von Knochenheilungsstörungen: Was ist evidenzbasiert? Eine Literaturübersicht und eigene Ergebnisse. *Trauma Berufskrankh*. 2006;8(3):142-52. German.
51. Gollwitzer H, Gloeck T, Brandner H. Extrakorporale Stoßwellentherapie. *Trauma Berufskrankh*. 2008;10(2):215-8. German.
52. Mundi R, Petis S, Kaloty R, Shetty V, Bhandari M. Low-intensity pulsed ultrasound: Fracture healing. *Indian J Orthop*. 2009;43(2):132-40.
53. Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst*. 1988;48(1):1-11.
54. Ilizarov GA, Frankel VH. The Ilizarov External Fixator, a physiologic method of orthopaedic reconstruction and skeletal correction. A conversation with Prof. G. A. Ilizarov and Victor H. Frankel. *Orthop Rev*. 1988;17(11):1142-54.

55. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res.* 1989(238):249-81.
56. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res.* 1989(239):263-85.
57. Scholz AO, Gehrman S, Glombitza M, Kaufmann RA, Bostelmann R, Flohe S, Windolf J. Reconstruction of septic diaphyseal bone defects with the induced membrane technique. *Injury.* 2015;46 Suppl 4:S121-4.
58. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am.* 2010;41(1):27-37.
59. Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, Lynch S, Friedlaender GE. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 1:48-54.
60. Einhorn TA. The Wnt signaling pathway as a potential target for therapies to enhance bone repair. *Sci Transl Med.* 2010;2(42):42ps36.
61. 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(6):1032-44.
62. Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg.* 2004;33(6):565-78.
63. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-9.
64. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242(4885):1528-34.
65. Einhorn TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair: Challenges and opportunities. *Indian J Orthop.* 2011;45(6):489-91.

66. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(1):87-105.
67. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009;136(22):3699-714.
68. Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9):2501-8.
69. Huang Z, Wang D, Ihida-Stansbury K, Jones PL, Martin JF. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet.* 2009;18(15):2791-801.
70. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(346):26-37.
71. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* 1998;22(6):591-603.
72. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res.* 1994(301):302-12.
73. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TSI. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(6):827-38.
74. Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(5):734-50.

75. Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzini A, Lindholm TC, Jalovaara P, Urist MR. The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int Orthop*. 1997;21(3):194-200.
76. Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. Bovine-derived bone protein as a bone graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Trauma*. 1997;11(7):496-508.
77. 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(12):1778-90.
78. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, Schelling SH, Carmel LA. Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(349):205-17.
79. 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(6):816-22.
80. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(8):1425-35.
81. den Boer FC, Bramer JA, Blokhuis TJ, Van Soest EJ, Jenner JM, Patka P, Bakker FC, Burger EH, Haarman HJ. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone*. 2002;31(1):158-64.
82. 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(1):83-9.
83. Blokhuis TJ, den Boer FC, Bramer JA, Jenner JM, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Biomechanical and histological aspects of fracture healing, stimulated with osteogenic protein-1. *Biomaterials*. 2001;22(7):725-30.

84. Halloran D, Durbano HW, Nohe A. Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *J Dev Biol.* 2020;8(3).
85. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
86. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(3):469-74.
87. Dewulf N, Verschueren K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Vande Spiegle K, Miyazono K, Huylebroeck D, Ten Dijke P. Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology.* 1995;136(6):2652-63.
88. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5330-8.
89. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014;28:269-86.
90. Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem.* 2013;114(5):975-84.
91. Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, Guan K, Krebsbach PH, Wang CY. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med.* 2009;15(6):682-9.
92. Yao Z, Li Y, Yin X, Dong Y, Xing L, Boyce BF. NF-kappaB RelB negatively regulates osteoblast differentiation and bone formation. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):866-77.
93. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res.* 1988(236):249-57.
94. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998;16(3):247-52.

95. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S66-72.
96. Medtronic. Kodierung und Vergütung in der stationären Versorgung 2018. InductOs®1,5 mg/ml Pulver, Lösungsmittel und Matrix für Matrix zur Implantation. Diboterminalfa (rhBMP-2*) Meerbusch: Medtronic; 2018 [cited 2021 Jan 10]. Available from: https://www.medtronic.com/content/dam/medtronic-com/de-de/hcp/documents/reimbursement/wirbels%C3%A4ulen Chirurgie/2018/UC201807984D_E_inductos_reimbursement-2018_medtronic.pdf. German.
97. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A (2 Suppl 1):S151-8.
98. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007;31(6):721-7.
99. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, Aro H, Atar D, Bishay M, Borner MG, Chiron P, Choong P, Cinats J, Courtenay B, Feibel R, Geulette B, Gravel C, Haas N, Raschke M, Hammacher E, van der Velde D, Hardy P, Holt M, Josten C, Ketterl RL, Lindeque B, Lob G, Mathevon H, McCoy G, Marsh D, Miller R, Munting E, Oevre S, Nordsletten L, Patel A, Pohl A, Rennie W, Reynders P, Rommens PM, Rondia J, Rossouw WC, Daneel PJ, Ruff S, Ruter A, Santavirta S, Schildhauer TA, Gekle C, Schnettler R, Segal D, Seiler H, Snowdowne RB, Stapert J, Taglang G, Verdonk R, Vogels L, Weckbach A, Wentzensen A, Wisniewski T, Group BMPEiSfTTS. 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(12):2123-34.
100. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, Kregor PJ, Nordsletten L, Paiement G, Patel A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(6):1258-65.

101. 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 (Phila Pa 1976)*. 2000;25(3):376-81.
102. Carofino BC, Lieberman JR. Gene therapy applications for fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90 Suppl 1:99-110.
103. Entwicklung der Gentherapie. Stellungnahme der Senatskommission für Grundsatzfragen der Genforschung. Deutsche Forschungsgemeinschaft; 2006.
104. Oberholzer A, Stahel P, Tschoke SK, Ertel W. Stellenwert der Gentherapie in Unfallchirurgie und Orthopädie. *Unfallchirurg*. 2006;109(7):521-27. German.
105. Department of Health UK. The Government's Expenditure Plans 2001-2002 to 2003-2004 and Main Estimates 2001-2002.
106. Bundesverfassung der Schweizerischen Eidgenossenschaft vom 29. Mai 1874, (Oct 1, 1996).
107. Kaufmann KB, Buning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*. 2013;5(11):1642-61.
108. Smith E, Blomberg P. Genterapi – från idé till verklighet. *Lakartidningen*. 2017;114:1-5. Swedish.
109. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(3):110.
110. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003;80(1-2):148-58.
111. Merkel O. Komplexisierung von Sirna zum spezifischen Knock-Down von Luciferase in Skov-3/Luc- und 3T3-Zellen [Diplomarbeit]. Marburg: Universität Marburg; 2006. German.

112. Carter B. Viral Vectors for Gene Therapy. In: Mountain Aea, editor. Biotechnology. 5a. 2nd ed. Wiley: VCH; 1999. p. 395-426.
113. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 1998;80(1):35-47.
114. Pahle J, Walther W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(4):443-61.
115. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *J Gene Med.* 2013;15(2):65-77.
116. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.* 2000;18(3):119-28.
117. Musgrave DS, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg.* 2002;10(1):6-15.
118. Franceschi RT, Yang S, Rutherford RB, Krebsbach PH, Zhao M, Wang D. Gene therapy approaches for bone regeneration. *Cells Tissues Organs.* 2004;176(1-3):95-108.
119. Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 2013;36(1):1-22.
120. Lukashev AN, Zamyatnin AA, Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc).* 2016;81(7):700-8.
121. Pelled G, Ben-Arav A, Hock C, Reynolds DG, Yazici C, Zilberman Y, Gazit Z, Awad H, Gazit D, Schwarz EM. Direct gene therapy for bone regeneration: gene delivery, animal models, and outcome measures. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):13-20.
122. Shapiro G, Lieber R, Gazit D, Pelled G. Recent Advances and Future of Gene Therapy for Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(4):504-11.
123. Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med.* 1999;5(7):753-9.

124. Betz OB, Betz VM, Nazarian A, Pilapil CG, Vrahas MS, Boussein ML, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Evans CH. Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(2):355-65.
125. Egermann M, Lill C, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, Baltzer A. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther.* 2006;13(17):1290-9.
126. Mahr JA, Gooding LR. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev.* 1999;168:121-30.
127. Noguchi P. Risks and benefits of gene therapy. *N Engl J Med.* 2003;348(3):193-4.
128. Schmidt M, Le Deist F, Wulraat N, McIntyre E, Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Radford I, Vileval J-L, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for x-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003;384(3):255-6.
129. Abdallah B, Sachs L, Demeneix BA. Non-viral gene transfer: applications in developmental biology and gene therapy. *Biol Cell.* 1995;85(1):1-7.
130. Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* 2003;10(6):453-8.
131. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982;1(7):841-5.
132. Wells DJ. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther.* 2004;11(18):1363-9.
133. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 2002;9(24):1647-52.
134. Furth PA. Gene transfer by biolistic process. *Mol Biotechnol.* 1997;7(2):139-43.
135. Cotten M, Wagner E. Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol.* 1993;4(6):705-10.

136. Vaysse L, Harbottle R, Bigger B, Bergau A, Tolmachov O, Coutelle C. Development of a self-assembling nuclear targeting vector system based on the tetracycline repressor protein. *J Biol Chem*. 2004;279(7):5555-64.
137. Nagasaki T, Kawazu T, Tachibana T, Tamagaki S, Shinkai S. Enhanced nuclear import and transfection efficiency of plasmid DNA using streptavidin-fused importin-beta. *J Control Release*. 2005;103(1):199-207.
138. Ahn CH, Chae SY, Bae YH, Kim SW. Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *J Control Release*. 2002;80(1-3):273-82.
139. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;60(2):247-66.
140. Breunig M, Hozsa C, Lungwitz U, Watanabe K, Umeda I, Kato H, Goeperich A. Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *J Control Release*. 2008;130(1):57-63.
141. Breunig M. Nicht-virale Genfähren: Bioabbaubare Polymere als Transporter ins Zellinnere. *Pharmazeutische Zeitung*. 2008;153(5). German.
142. Breunig M, Bauer S, Goeperich A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(1):112-28.
143. Kichler A, Freulon I, Boutin V, Mayer R, Monsigny M, Midoux P. Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J Gene Med*. 1999;1(2):134-43.
144. Demeneix B, Behr J, Boussif O, Zanta MA, Abdallah B, Remy J. Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;30(1-3):85-95.
145. Behr JP. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses didnot exploit. *Chimica*. 1997;51:34-6.
146. Kabanov AV, Kabanov VA. DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells. *Bioconjug Chem*. 1995;6(1):7-20.

147. Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Mechtler K, Wagner E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem.* 1992;3(6):533-9.
148. Choi YH, Liu F, Kim JS, Choi YK, Park JS, Kim SW. Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier. *J Control Release.* 1998;54(1):39-48.
149. Katayose S, Kataoka K. Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem.* 1997;8(5):702-7.
150. Toncheva V, Wolfert MA, Dash PR, Oupicky D, Ulbrich K, Seymour LW, Schacht EH. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1380(3):354-68.
151. Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N, Paradis G, Nguyen HK, Ochietti B, Suzdaltseva YG, Bartakova EV, Bronich TK, St-Pierre Y, Alakhov VY, Kabanov AV. Block and graft copolymers and NanoGel copolymer networks for DNA delivery into cell. *J Drug Target.* 2000;8(2):91-105.
152. 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(14):1183-92.
153. Wagner E. Strategies to improve DNA polyplexes for in vivo gene transfer: will "artificial viruses" be the answer? *Pharm Res.* 2004;21(1):8-14.
154. Jayant RD, Sosa D, Kaushik A, Atluri V, Vashist A, Tomitaka A, Nair M. Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(10):1433-45.
155. Peng L. Editorial: Current Gene Therapy on Non-viral Gene Delivery and Therapy. *Curr Gene Ther.* 2018;18(1):2.
156. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg A, Raschke M. Die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF- β 1 aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Lactid) Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung. *Chirurg.* 2000;71(9):1016-22. German.

157. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*. 2001;28(4):341-50.
158. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly (D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(4):449-55.
159. Schmidmaier G, Baehr K, Mohr S, Kretschmar M, Beck S, Wildemann B. Biodegradable polylactide membranes for bone defect coverage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(4):439-44.
160. Kulkarnie RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. Polylactid acid for surgical implants. *Arch Surg*. 1996;93:839-43.
161. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, Raschke M. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003;65(1):157-62.
162. Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stockle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials*. 2005;26(18):4035-40.
163. Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials*. 2004;25(17):3639-44.
164. Pauly S, Back DA, Kaeppler K, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13(1):208.

165. Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9(1):135.
166. Greiner SH, Wildemann B, Back DA, Alidoust M, Schwabe P, Haas NP, Schmidmaier G. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly (D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. *Acta Orthop.* 2008;79(5):717-25.
167. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, Raschke M. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. *J Orthop Res.* 2004;22(3):514-9.
168. Reinwart J. Berlin: unpublished.
169. Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini M, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, Atkinson M. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone.* 1996;18(2):125-32.
170. Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn TA, Haas NP, Raschke M. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma.* 2004;30(1):35-42.
171. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of laboratory animal management and welfare.* Oxford: Wiley Blackwell; 2013.
172. Käthner R. Lokale Applikation von BMP-2-Plasmiden mittels non-viralen Vektors zur Stimulation der Frakturheilung: eine histologische Untersuchung am Rattenmodell [Dissertation]. Berlin: Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2015. German.
173. Reilly J. Basic animal handling and anaesthesia for rats, mice and rabbits. In: Green M, editor. *Experimental transplantation models in small animals.* Chur, Switzerland: Harwood; 1995. p. 1-53.

174. Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e. V., Gesellschaft für Versuchstierkunde. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren 2009 [cited 2020 Jan 1]. Available from: https://www.tierschutz-tvt.de/alle-merkblaetter-und-stellungnahmen/?no_cache=1&download=TVT___GV_Solas-MB_137___Blutentnahme_bei_Versuchstieren___Mai_2009_.pdf&did=202. German.
175. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595-610.
176. Schwabe P, Greiner S, Ganzert R, Eberhart J, Dahn K, Stemberger A, Plank C, Schmidmaier G, Wildemann B. Effect of a novel nonviral gene delivery of BMP-2 on bone healing. *Sci World J.* 2012;2012:560142.
177. Rockwood CA, Bucholz RW, Green DP, Court-Brown CM, Heckman JD, Tornetta P. The epidemiology of fractures. In: Rockwood CA, Bucholz RW, Green DP, Court-Brown CM, Heckman JD, Tornetta P, editors. *Rockwood and Green's Fractures in Adults.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 53-84.
178. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop.* 2011;35(9):1271.
179. Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis.* 1997;56(1):63-72.
180. Faßbender M, Minkwitz S, Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. Stimulation of bone healing by sustained bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) delivery. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):8539-52.
181. van der Stok J, Koolen M, de Maat M, Amin Yavari S, Alblas J, Patka P, Verhaar J, van Lieshout E, Zadpoor AA, Weinans H. Full regeneration of segmental bone defects using porous titanium implants loaded with BMP-2 containing fibrin gels. *Eur Cell Mater.* 2015;2015(29):141-54.

182. Orth M, Kruse N, Braun B, Scheuer C, Holstein J, Khalil A, Yu X, Murphy W, Pohlemann T, Laschke M. BMP-2-coated mineral coated microparticles improve bone repair in atrophic non-unions. *Eur Cell Mater.* 2017;33:1-12.
183. Wei X, Egawa S, Matsumoto R, Yasuda H, Hirai K, Yoshii T, Okawa A, Nakajima T, Sotome S. Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model. *J Orthop Res.* 2018;36(1):129-37.
184. Betz O, Betz V, Nazarian A, Egermann M, Gerstenfeld L, Einhorn T, Vrahas M, Bouxsein M, Evans CH. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther.* 2007;14(13):1039.
185. Virk MS, Lieberman JR. Biologic adjuvants for fracture healing. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):225.
186. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, JOLLA L, WU L, McALLISTER P, LEE YP, KABO JM, FINERMAN GA, BERK AJ. 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(7):905-17.
187. Schillinger U, Wexel G, Hacker C, Kullmer M, Koch C, Gerg M, Vogt S, Ueblacker P, Tischer T, Hensler D. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res.* 2008;25(12):2946-62.
188. 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(6):634-43.
189. Evans CH, Huard J. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(4):234.
190. Betz OB, Betz VM, Abdulazim A, Penzkofer R, Schmitt B, Schröder C, Augat P, Jansson V, Müller PE. Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts. *Hum Gene Ther.* 2009;20(12):1589-96.

191. Fang J, Zhu Y, Smiley E, Bonadio J, Rouleau JP, Goldstein SA, Mccauley IK, Davidson BI, Roessler BJ. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:5753-8.
192. Williams JC, Maitra S, Anderson MJ, Christiansen BA, Reddi AH, Lee MA. BMP-7 and bone regeneration: evaluation of dose–response in a rodent segmental defect model. *J Orthop Trauma*. 2015;29(9):e336-41.
193. Betz VM, Betz OB, Glatt V, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Boussein ML, Vrahas MS, Evans CH. Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose. *Hum Gene Ther*. 2007;18(10):907-15.
194. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45.
195. Schliephake H. Application of bone growth factors—the potential of different carrier systems. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;14(1):17-22.
196. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res*. 2000;50(2):227-38.
197. 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(1 Suppl 2):S128-35.
198. Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C. Characterization of absorbable collagen sponges as recombinant human bone morphogenetic protein-2 carriers. *Int J Pharm*. 1999;185(1):51-60.
199. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(4):592-7.

200. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res.* 1999;46(2):193-202.
201. Back DA, Pauly S, Rommel L, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B, Greiner SH. Effect of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC musculoskeletal disorders.* 2012;13(1):42.
202. Faßbender M, Minkwitz S, Kronbach Z, Strobel C, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B. Local gentamicin application does not interfere with bone healing in a rat model. *Bone.* 2013;55(2):298-304.
203. Wildemann B, Lange K, Strobel C, Faßbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury.* 2011;42(8):746-52.
204. Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone.* 2006;38(1):136-44.
205. Zhu L, Chuanchang D, Wei L, Yilin C, Jiasheng D. Enhanced healing of goat femur-defect using BMP7 gene-modified BMSCs and load-bearing tissue-engineered bone. *J Orthop Res.* 2010;28(3):412-8.
206. Chang SC-N, Lin T-M, Chung H-Y, Chen PK-T, Lin F-H, Lou J, Jeng L-B. Large-Scale Bicortical Skull Bone Regeneration Using Ex vivo Replication-Defective Adenoviral-Mediated Bone Morphogenetic Protein—2 Gene—Transferred Bone Marrow Stromal Cells and Composite Biomaterials. *Oper Neurosurg.* 2009;65(6 Suppl):ons75-83.
207. Ishihara A, Zekas LJ, Litsky AS, Weisbrode SE, Bertone AL. Dermal fibroblast-mediated BMP2 therapy to accelerate bone healing in an equine osteotomy model. *J Orthop Res.* 2010;28(3):403-11.
208. Bertone A, Pittman D, Bouxsein M, Li J, Clancy B, Seeherman H. Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res.* 2004;22(6):1261-70.

209. 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(3):197-202.
210. Egermann M, Baltzer A, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, Lill C. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther.* 2006;17(5):507-17.
211. Herrmann L. Animal experimental studies of fracture healing with different methods of treatment. *Acta Biol Med Germ.* 1968;20(6):845.
212. Garces G, Garcia-Castellano J, Nogales J. Longitudinal overgrowth of bone after osteotomy in young rats: influence of bone stability. *Calcif Tissue Int.* 1997;60(4):391-3.
213. Molster AO, Gjerdet NR, Alho A, Bang G. Fracture healing after rigid intramedullary nailing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1983;54(3):366-73.
214. Aronson J, Shen X, Gao G, Miller F, Quattlebaum T, Skinner R, Badger T, Lumpkin Jr C. Sustained proliferation accompanies distraction osteogenesis in the rat. *J Orthop Res.* 1997;15(4):563-9.
215. Aronson J, Shen X, Skinner R, Hogue W, Badger T, Lumpkin Jr C. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res.* 1997;15(2):221-6.
216. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res.* 1984;2(1):97-101.
217. Buza III JA, Einhorn T. Bone healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016;13(2):101.
218. Ornitz DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):205-13.
219. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1572-7.

220. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 2000;31(3):375-88.
221. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, Matsushita T, Nakamura K, Group T. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2735-43.
222. Charles LF, Woodman JL, Ueno D, Gronowicz G, Hurley MM, Kuhn LT. Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice. *Exp Gerontol.* 2015;64:62-9.
223. Khorsand B, Nicholson N, Do A-V, Femino JE, Martin JA, Petersen E, Guetschow B, Fredericks DC, Salem AK. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. *J Control Release.* 2017;248:53-9.
224. DiGiovanni CW, Lin SS, Baumhauer JF, Daniels T, Younger A, Glazebrook M, Anderson J, Anderson R, Evangelista P, Lynch SE. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB and beta-tricalcium phosphate (rhPDGF-BB/ β -TCP): an alternative to autogenous bone graft. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(13):1184-92.
225. FDA, FDA Executive Summary: BioMimetic's Augment Bone Graft.
226. Wang X, Zhang Y, Ji W, Ao J. Categorising bone defect hematomas—Enhance early bone healing. *Med Hypotheses.* 2018;113:77-80.
227. Emara KM, Diab RA, Emara AK. Recent biological trends in management of fracture non-union. *World J Orthop.* 2015;6(8):623-8.

10 Eidesstattliche Versicherung

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

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

11 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jana Reinwart, geb. Eberhart hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: P Schwabe, S Greiner, R Ganzert, **J Eberhardt**, K Dähn, A Stemberger, C Plank, G Schmidmaier, B Wildemann. Effect of a novel non viral gene delivery of BMP-2 on bone healing. The Scientific World Journal Vol. 2012, 2012:560142. Beitrag im Einzelnen: Anteil an der Methodik der Zellkulturen und deren Ergebnisse, Anteil an anästhesiologischer/operativer, radiologischer und biomechanischer Methodik, Nachsorgeuntersuchungen, Erarbeitung der biomechanischen und anteilig der radiologischen Ergebnisse.

Publikation 2: Schwabe P, Wildemann B, Stemberger A, Plank C, Ganzert R, **Eberhardt J**, Dähn K, Haas NP, Schmidmaier G. Non-viraler Gentransfer von BMP-2 Plasmiden mit einem Copolymer Protected Gene Vector (COPROG) inkorporiert in eine Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung zur Beschleunigung der Frakturheilung. Meeting Abstract (EF17-539) Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 94. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Unfallchirurgie und 49. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie und Unfallchirurgie 22.- 25.10.2008 Berlin Beitrag im Einzelnen: Anteil an der Methodik und den Ergebnissen der Zellkulturen. Anteil an anästhesiologischer/operativer, radiologischer und biomechanischer Methodik, Nachsorgeuntersuchungen, Erarbeitung der biomechanischen und anteilig radiologischen Ergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

12 Lebenslauf

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

13 Publikationen

Teile dieser Promotionsarbeit wurden in folgenden Artikeln oder Kongressbeiträgen publiziert:

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

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

Weitere Kongressbeiträge:

Stempel M, Kricheldorf J, Reinwart J, Thamm OC. Herausforderungen und Chancen der postbariatrischen Chirurgie. Ein Résumé aus 12 Monaten im Hause eines Zentrums für Adipositaschirurgie. 50. Jahrestagung der DGPRÄC vom 26. – 28.09.2019 in Hamburg. Vortrag

Reinwart J. Stempel M, Kricheldorf J, Ploching M, Thamm OC. Plastische Rekonstruktionen in Kopf-Halsbereich: Interdisziplinäre Zusammenarbeit mit der HNO an einem Krankenhaus der Maximalversorgung. 50. Jahrestagung der DGPRÄC vom 26. – 28.09.2019 in Hamburg. Poster

Kricheldorf J, Reinwart J, Stempel M, von Fritschen U, Thamm OC. Das Brustimplantat-assoziierte anaplastische großzellige Lymphom (BIA-ALCL) – Fallvorstellungen und aktuelles Literatur-Update. 50. Jahrestagung der DGPRÄC vom 26. – 28.09.2019 in Hamburg. Vortrag

Kricheldorf J, Stempel M, Reinwart J, Mau C, Untch M, Thamm OC. Lymphomerkrankungen durch Brustimplantate?“ Das Brustimplantat-assoziierte anaplastische großzellige Lymphom – die ersten deutschen Fälle. chir prax 04/2019 (in press)

14 Danksagung

Ich bedanke mich bei dem damaligen Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow – Klinikum, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Haas, sowie bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda aus dem Julius Wolff Institut in deren Abteilungen ich meine Promotionsarbeit durchführen durfte. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier für die initiale Betreuung der Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. David Back für die Übernahme der Betreuung, die stetige Motivierung, schnelle Beantwortung von Fragen und Begleitung bis zur Abgabe. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann für die langjährige Hilfestellung in der Durchführung dieses Themas. Meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Phillip Schwabe danke ich für die Zusammenarbeit im Bereich des operativen Teils der Arbeit. Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern im biomechanischen Labor im Julius-Wolff-Institut und bei Frau Camilla Bergmann für die Unterstützung im Labor bei die in-vitro Tests. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. med. Ricarda Käthner und Frau Kerstin Jungen, die mich die ganze Zeit begleiteten. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Geduld und stetige Motivation. Ein ausgesprochener Dank gilt meinem Ehemann und besten Freund Tino Reinwart für das Inkaufnehmen von familiären Unannehmlichkeiten und die Zeitgabe für die Fertigstellung dieses Projektes.