

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

DISSERTATION

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von BMP-2
beschichteten Kirschner-Drähten
- Eine Studie im Osteotomie-Modell der Ratte -

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Lange

aus Perleberg

Datum der Promotion: 14.02.2014

-Inhaltsverzeichnis-

Abstrakt	4
I EINLEITUNG	6
I.1 Knochenaufbau	7
I.2 Knochenheilung	9
I.3 Störung der Knochenheilung	11
I.3.1 Ätiologie der beeinträchtigten Knochenheilung	12
I.3.2 Therapie der beeinträchtigten Knochenheilung	13
I.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung	14
I.4.1 BMPs.....	16
I.4.2 BMP-2	16
I.4.3 Applikationsformen von BMP-2	19
I.5 Tiermodell für beeinträchtigte Knochenheilung	20
I.6 Zielstellung	21
I.7 Hypothese	21
II MATERIAL UND METHODEN	22
II.1 Studiendesign	22
II.1.1 Osteotomie-Modell.....	23
II.1.2 Beschichtete Titan-Kirschner-Drähte.....	23
II.2 Der operative Eingriff.....	24
II.3 Postoperative klinische und radiologische Untersuchungen	25
II.4 Biomechanische Testung	28
II.5 Histologische Untersuchungen	31
II.5.1 Fertigung der Knochenschnitte	31
II.5.2 Färben der histologischen Präparate	33
II.5.3 Immunhistochemische Färbung	36
II.5.4 Lichtmikroskopische Beurteilung.....	37
II.6 Histomorphometrie	37
II.7 Statistik	40
II.8 Verwendete Materialien und Geräte im Überblick.....	40

III	ERGEBNISSE.....	43
III.1	Ausfälle, Operationstoleranz und postoperativer Verlauf	43
III.2	Postoperative klinische und radiologische Untersuchungen	43
III.3	Biomechanische Testung	49
III.4	Histomorphologische Beobachtung	52
III.5	Histomorphometrie	60
IV	DISKUSSION.....	67
IV.1	Ergebnisse	68
IV.2	Nebeneffekte und mögliche Komplikationen	72
IV.3	Tiermodell einer verzögerten Knochenheilung	74
IV.4	BMP- Applikation	77
IV.5	Ausblick	80
V	ZUSAMMENFASSUNG	82
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	84
	Abkürzungsverzeichnis.....	97
	Abbildungsverzeichnis.....	98
	Tabellenverzeichnis	102

Abstrakt

Einleitung: Knochenheilungsstörungen stellen immer noch schwerwiegende Komplikation im klinischen Alltag dar. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluss von lokal appliziertem BMP-2 in einem verzögert heilendem Osteotomie-Modell der Ratte zu untersuchen.

Methoden: Die Tibiae von weiblichen 5 Monate alten Ratten wurden osteotomiert und mit Kirschner-Drähten intramedullär stabilisiert. Die Drähte waren mit der Trägersubstanz Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) beschichtet, in welche 50 µg BMP-2 eingearbeitet war. Im Rahmen der Studie wurden radiologische, histologische und biomechanische Untersuchungen durchgeführt, je nach Gruppenzugehörigkeit an den Tagen 5, 10, 28, 42 und 84 (n=48, 6 je Gruppe). Die histologische Aufarbeitung mit Anwendung unterschiedlicher Färbemethoden ließ die Beurteilung verschiedener Gewebequalitäten wie Knorpel, Inflammation und Mineralisierung zu. Mit der immunhistochemischen Färbung (alpha-SMA-Antikörper) konnte die Angiogenese im Kallus erfasst werden. Als Kontrollgruppe dienten Tiere aus der Studie zur Etablierung des Osteotomie-Modells von Kratzel et al.

Ergebnisse: Die radiologische Auswertung mittels Röntgenscore ergab eine weiter fortgeschrittene Knochenheilung mit teilweise vollständiger Konsolidierung des Osteotomiespalts in der BMP-Gruppe während es in der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von 84 Tagen nicht zu einer knöchernen Überbrückung kam. Die biomechanische Testung zeigte eine signifikant höhere Stabilität der mit BMP behandelten Tibiae nach 28 und 42 Tagen. In der Kontrollgruppe fiel ein großer reaktiver Kallus mit gesteigerter Gefäßdichte auf. In der BMP-Gruppe war sowohl die Kallusfläche als auch die Gefäßdichte 10 Tage post-Osteotomie signifikant reduziert werden, wobei der Knorpelanteil im frühen periostalen Kallus signifikant erhöht war. Des Weiteren war nach 42 Tagen eine signifikant gesteigerte Mineralisation infolge der BMP-Applikation zu detektieren.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse im zeitlichen Verlauf zeigen, dass die lokale BMP-2 Applikation von einem beschichteten Kirschner-Draht in einem verzögert heilendem Osteotomie-Modell der Ratte die Heilung stimuliert. Dabei scheint BMP eine frühe überschießende inflammatorische Reaktion zu verhindern und die Knochenheilung zu beschleunigen.

Abstract

Introduction: Impaired bone healing is still a severe complication in the clinic. Aim of the present study was to investigate the effect of locally delivered BMP-2 on a delayed osteotomy healing in a rat model.

Methods: The tibiae of 5-month old female rats were osteotomied and intramedullary stabilized with Kirschner-wire. The wires were coated with the carrier poly(d,l-lactide) (PDLLA) in which 50 µg BMP-2 were incorporated. Radiological, histological and biomechanical evaluations were performed, at days 5, 10, 28, 42, and 84 after osteotomy depending on the study group (n=48, 6 per group). The histological examination showed the qualities of the callus such as cartilage, inflammation and mineralization by using various staining methods. The immunohistological staining with antibodies against alpha-SMA showed the angiogenesis of the callus. As control group animals from the study establishing the osteotomy model by Kratzel et al. were included.

Results: The radiological analysis using a standardized roentgen score showed an advanced healing and partially complete union of the osteotomy in the BMP-group while in the control group there was no complete osseous bridging 84 days after surgery. The biomechanical testing showed significantly increased stability of the osteotomized tibiae treated with BMP at days 28 and 42. The control group showed a large reactive callus with an increased vascularization. With the application of BMP-2 the dimension of the callus was significantly decreased and there was a significant reduction of the hypervascularization 10 post intervention. In the BMP-group the cartilage fraction was significantly higher in the early periosteal callus. At 42 days a significantly enhanced mineralization of the callus was detected due to the BMP.

Conclusion: The results in the chronological course lead to the conclusion that the local application of BMP-2 from coated Kirschner-wires can rescue a delayed osteotomy healing in a rat model. The growth factor seems to inhibit an early hyper inflammatory reaction and also accelerates bone healing. The present study demonstrates that local BMP-2 application can stimulate delayed healing in a clinically relevant animal model.

I EINLEITUNG

Fast jeder zweite Mensch erleidet in seinem Leben einen Knochenbruch (Meisinger 2002). Meist regeneriert Knochen vollständig und kann seine ursprüngliche Form und Funktion wiederherstellen. Jedoch sind trotz großer Fortschritte im Bereich der Frakturbehandlung während der letzten Jahrzehnte Störungen im Heilungsprozess des Knochens noch häufig. Weltweit kommt es heute bei 5 bis 10 % aller Frakturen zu Störungen im physiologischen Ablauf der Knochenheilung (Bishop 2007). Die mitunter schwerwiegendste Komplikation ist das Ausbleiben der Knochenheilung und die Entstehung einer Pseudarthrose (griechisch: Falschgelenk). Eine gestörte Knochenheilung bedeutet für die betroffenen Patienten aufgrund der körperlichen und psychischen Belastung eine starke Beeinträchtigung der Lebensqualität. Aus ökonomischer Sicht ist das Auftreten von Pseudarthrosen sowohl für das Gesundheitssystem durch komplexe, kostenintensive und langwierige Therapien und Krankenhausaufenthalte als auch für das Sozialsystem durch den krankheitsbedingten Arbeitsausfall des Patienten mit einem sehr hohen Kostenaufwand behaftet (Heckman 1997).

Es ist davon auszugehen, dass es aufgrund der demographischen Entwicklung unserer Gesellschaft, die mit vielen altersassoziierten Erkrankungen wie Osteoporose und Diabetes mellitus einhergeht, zukünftig sogar noch häufiger zu beeinträchtigter Knochenheilung kommen wird. Daher ist es von großer Bedeutung eine optimale Frakturversorgung, gerade bei Patienten mit erhöhtem Risiko für eine Knochenheilungsstörung, zu erreichen.

Ein vielversprechender Ansatz bei Knochenheilungsstörung ist die Behandlung mit dem Bone morphogenetic Protein 2 (BMP-2). Die stimulierende Wirkung dieses Wachstumsfaktors auf Knochen wurde in vielen tierexperimentellen und auch klinischen Studien belegt (Govender 2002, Cheng 2003, Gautschi 2007). Im klinischen Alltag ist BMP-2 jedoch nur für limitierte Indikationen zugelassen. Um bei Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entstehung einer verzögerten Knochenheilung oder Pseudarthrose das Auftreten dieser zu vermeiden, könnte die lokale Behandlung mit einem BMP-2-beschichteten Nagel eine geeignete adjuvante Therapie darstellen, sodass auf sekundäre Eingriffe, die mit erhöhten Risiko für Komplikationen einhergehen, verzichtet werden kann und die Heilung primär erfolgt.

I.1 Knochenaufbau

Knochen ist ein dynamisches biologisches System mit einer komplexen Struktur. Das knöchernerne Gerüst des Menschen besteht aus über zweihundert Knochen. Es schützt die inneren Organe und stützt den Körper. Knochen muss steif sein, um Belastungen wie Zug und Druck standzuhalten. Knochen muss aber auch flexibel sein, um bei Verformung nicht zu zerbrechen. Zudem muss Knochen leicht sein, um im Zusammenspiel mit den Muskeln ein hohes Maß an Beweglichkeit zu ermöglichen. Die einzigartige Architektur des Knochens wird diesen konträren Ansprüchen gerecht.

Knochen variieren in ihrer Größe, Form und Belastbarkeit. Unterschieden werden lange, kurze, platte, luftgefüllte und unregelmäßige Knochen. Lange Knochen, auch Röhrenknochen bezeichnet, sind typisch für die Gliedmaßen. Sie haben einen charakteristischen Aufbau, der aus zwei verbreiterten Knochenenden (Epiphysen), den darunter liegenden Metaphysen mit den Wachstumsfugen und einem Knochenschaft (Diaphyse) besteht. Der schmale Knochenschaft ist das wichtigste Element für die Tragfähigkeit und Steifigkeit des Röhrenknochens (Schweiberer 1999). Die Diaphyse besteht außen aus kompaktem Knochengewebe (Substantia corticalis), die im Inneren die Markhöhle einschließt. Die funktionelle Grundeinheit der Kortikalis sind Osteone. Ein Osteon entsteht aus konzentrisch angelegten Speziallamellen in deren Zentrum der Havers-Kanal verläuft. Als Verbindung zwischen den Osteonen liegen die Schaltlamellen, Reste von älteren, abgebauten Osteonen. Im Inneren besteht der Knochen aus einem leichten, schwammartigen Trabekelgerüst (Substantia spongiosa) und dem Markraum (Cavitas medullaris), wo das Knochenmark gebildet wird. Der gesamte Knochen wird außer an den verknorpelten Gelenkflächen vom Periost, einer gut durchbluteten und innervierten Bindegewebsschicht, überzogen. Im Inneren des Knochens sind die Oberflächen der Knochenbälkchen und Markhöhlen mit Endost bedeckt.

Da Knochen ein sehr stoffwechselaktives Gewebe ist, besitzt er ein hoch entwickeltes Gefäßsystem. Die Blutversorgung des äußeren Drittels erfolgt über das Periost, das restliche Knochengewebe wird durch das Havers-System, welches sich aus der Arteria nutritiva in der Kortikalis verzweigt, versorgt.

Das Knochengewebe besteht zu 71 % aus anorganischen, zu 21 % aus organischen Material und zu 8 % aus Wasser (Trostle 1996). Den anorganischen Anteil an der Knochenmatrix machen hauptsächlich Kalzium und Phosphat in Form von

Hydroxylapatitkristallen aus. Die organische Knochenmatrix dient als strukturelles Gerüst für die Anreicherung von anorganischen Kristallen. Sie besteht zu 95 % aus Kollagen I. Des Weiteren zählen die osteogenen Zellen, welche vom Knochen ausgehen, zu den organischen Bestandteilen.

Auf zellulärer Ebene besteht Knochen aus über Zellfortsätze und Gap Junctions quervernetzte Osteozyten, welche in die Knochenmatrix eingebettet sind. Im Knochen findet ein ständiger Auf- und Umbau (Modelling und Remodelling) statt (Abb. 1). Dabei sind Osteoklasten für den Knochenabbau zuständig (Marks 1988). Die mehrkernigen Riesenzellen gehören zum mononukleären Phagozytensystem und entstehen durch die Verschmelzung von Monozyten aus dem Knochenmark. Wenn die aktiven Osteoklasten mit der Knochenresorption beginnen, entsteht eine sogenannte Howship'sche Lakune zwischen Osteoklast und Knochenmatrix (Väänänen 1988). Aktive Osteoblasten füllen die entstandene Resorptionshöhle wieder auf und agieren somit als Gegenspieler zu den Osteoklasten. Ihre Vorläuferzellen sind die Osteoprogenitorzellen mesenchymalen Ursprungs aus dem Knochenmark und dem Periost. An den inneren und äußeren Knochenoberflächen befinden sich die Knochensaumzellen (Bone lining cells). Die Bone lining cells stehen über ihre Zellfortsätze miteinander und mit den tieferliegenden Osteozyten in Verbindung (Miller 1989). Wenn sich Osteoblasten komplett in der Knochenmatrix eingemauert haben, differenzieren sie zu Osteozyten, die mitotisch inaktiv sind und über mechanosensorische Signale in die Regulierung des

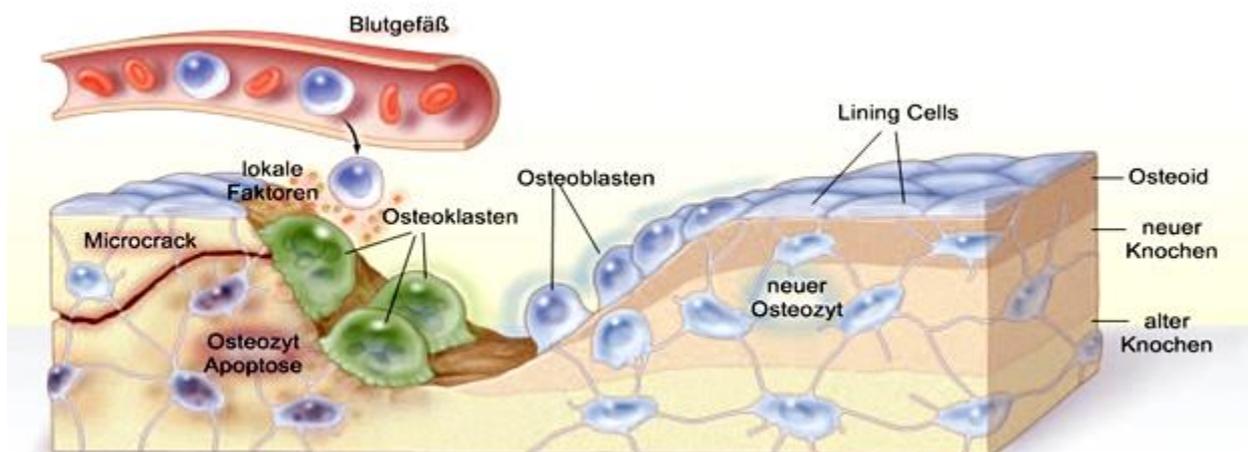


Abb. 1: Der Remodelling Zyklus eines Knochentrabekels.

Bei einer Verletzung des Knochens (Microcrack) setzen Lining Cells und Osteozyten lokale Faktoren frei, die Zellen aus dem Blut und Knochenmark anlocken. Diese entwickeln sich zu Osteozyten und formen eine Resorptionshöhle. Osteoblasten füllen diese Höhle mit neuem Knochen wieder auf. In Knochenmatrix eingeschlossene Osteoblasten werden zu Osteozyten oder sterben ab.

(Darstellung übernommen und modifiziert von Seeman E, Delmas PD. Bone Quality - The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. N Engl J Med. 2006 May 25;354(21):2250-61.)

Knochenumbaus eingreifen (Jacobs 2010). Das Remodelling ist eine Reaktion des Knochens auf mechanische Reize. Hierbei kommt es zu minimalen Knochenverformungen und es entstehen sogenannte „Microcracks“. Genau an diesen Stellen setzt der Organismus nun an, die Knochenmasse zu verstärken und an die Belastung zu adaptieren (Seemann 2006). Kann der Knochen der Krafteinwirkung nicht mehr standhalten, bricht er.

I.2 Knochenheilung

Eine Verletzung des Knochens, die mit dem Verlust der Integrität des Knochens einhergeht, wird als Fraktur bezeichnet. Mit einer Osteotomie kann eine Diskontinuität des Knochens künstlich herbeigeführt werden. Die Wiederherstellung der Integrität des Knochens wird dann nicht als Frakturheilung sondern als Knochenheilung bezeichnet. Im Gegensatz zu anderen Gewebearten besitzt Knochen die einzigartige Eigenschaft vollständig, ohne Narbenbildung zu regenerieren und seine ursprünglichen Form und Belastbarkeit wiederherzustellen (DeLacure 1994).

Die Frakturheilung ist ein komplexer physiologischer Vorgang. Um neue Therapiemodelle zur besseren Regeneration von verletztem Knochengewebe zu entwickeln, ist es von essentieller Bedeutung, den Mechanismus der Knochenheilung zu verstehen.

Der Knochenheilungsprozess wird unterschieden in primäre Knochenheilung und sekundäre Knochenheilung (Schenk 1977):

Die primäre Knochenheilung zeichnet sich durch ein Zusammenwachsen der Knochenenden ohne röntgenologisch sichtbare Kallusbildung aus. Eine Voraussetzung für diese Art der Heilung ist ein direkter Kontakt der Fraktarenden in anatomisch exakter Ausrichtung und eine sehr hohe Stabilität. Diese wird in der Regel nur mit einer chirurgischen Osteosynthese erreicht.

Die sekundäre Knochenheilung ist im klinischen Alltag am häufigsten zu beobachten. Sie tritt immer auf, wenn ein Frakturspalt vorliegt oder die Bruchenden gegeneinander beweglich sind. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Kallus, welcher aus kollagenfaserigem Bindegewebe und Knorpel besteht. Sekundär erfolgt ein Umbau des weichen Kallus in mineralisiertes Knochengewebe.

Die sekundäre Knochenheilung verläuft in drei Stadien, die teilweise parallel verlaufen (Simmons 1985):

Reaktive Phase (drei bis vier Wochen): Die Fraktur geht in der Regel immer mit dem Zerreißen nutritiver Gefäße des Knochens einher. Das einströmende Blut aus den verletzten Gefäßen gerinnt und ein Hämatom entsteht im Frakturspalt. Durch das Absterben von Zellen im Hämatom wird eine inflammatorische Reaktion hervorgerufen. Entzündungszellen und Makrophagen infiltrieren das umliegende Gewebe und sezernieren Zytokine. Dabei spielen vor allem Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Knochenreparatur-Kaskade (Einhorn 1995, Gerstenfeld 2003). Wachstumsfaktoren (siehe Absatz I.4), die in das Frakturhämatom ausgeschüttet werden, regen Zelldifferenzierung und Angiogenese an. Durch das Einwachsen von Fibroblasten und die Durchsprössung mit Kapillaren entsteht Granulationsgewebe.

Reparative Phase (eine Woche bis Monate): Ausgehend vom Periost beginnt die intramembranöse Ossifikation. Dabei differenzieren mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Periost zu osteogenen Zellen und bilden Geflechtknochen („harter Kallus“). Zwischen Frakturrenden, bei denen eine geringere mechanische Stabilität vorliegt, kommt es über die Bildung von Knorpelgewebe zur enchondralen Ossifikation. Dazu werden MSCs aus dem umliegenden Gewebe rekrutiert und differenzieren zu Chondroblasten, welche proliferieren und den „weichen Kallus“ formen. Die Quantität des neugebildeten Knorpels hängt vom Bewegungsausmaß im Frakturgebiet ab. Je instabiler die Fraktur, desto mehr Ersatzgewebe wird gebildet (Klein 2003). Die Chondrozyten produzieren Kollagen II und Proteoglykane. Diese stabilisieren die Frakturfragmente. Der Knorpel hypertrophiert, kalzifiziert und wird von Chondroklasten entfernt. Sekundär differenzieren neue MSCs, die mit den einwachsenden Kapillaren in den Knorpel wandern, zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten. Diese produzieren Geflechtknochen, um den Knorpel zu ersetzen (Einhorn 1998).

Remodellierungsphase (3-24 Monate): Es erfolgt der Umbau zur originären Knochenstruktur. Hierzu werden die Geflechtknochentrabekel von Osteoklasten resorbiert und durch Lamellenknochen ersetzt. Die abschließenden Umbauprozesse entsprechen dem Wolff'schen Gesetz, wonach sich Knochen in Form und Struktur der mechanischen Beanspruchung anpasst. Es handelt sich dabei um einen Prozess von Erneuerung und Reparatur, der auch im intakten Skelett kontinuierlich stattfindet (McKibbin 1978)

I.3 Störung der Knochenheilung

Trotz der großen Fortschritte auf dem Gebiet der Frakturbehandlung sind bei 10% der jährlich auftretenden Frakturen weitere chirurgische Eingriffe wegen beeinträchtigter Knochenheilung notwendig (Einhorn 1995). Die bedeutendsten Komplikationen bei der Heilung von geschlossenen Frakturen sind die Osteomyelitis, die verzögerte Knochenheilung und vor allem das Entstehen einer Pseudarthrose. Der Begriff Pseudarthrose stammt aus dem Griechischen und bedeutet Falschgelenk.

Die Fraktur des Unterschenkelhalses stellt mit einer Inzidenz von 26:100.000 die häufigste Fraktur der langen Röhrenknochen dar (Court-Brown 2006). Zudem kommt es bei Tibiaschaftfrakturen im Vergleich zu Frakturen anderer langer Röhrenknochen am häufigsten zu Pseudarthrosen (Tzioupis 2007). In einer retrospektiven Untersuchung von Coles konnte nachgewiesen werden, dass es bei geschlossenen Tibiaschaftfrakturen abhängig von der Therapie in bis zu 17 % der Fälle zu verzögerter Knochenheilung oder einer Pseudarthrose kommt (Coles 2000). Dabei fiel auf, dass die höchsten Raten für schlechte Heilung bei einer konservativen Behandlung mit Gips und bei einer unaufgebohrten Marknagelung auftreten.

Definitionsgemäß spricht man von einer verzögerten Knochenheilung (delayed union), wenn nach vier bis sechs Monaten keine Konsolidierung stattgefunden hat, eine Verschmelzung der Knochenenden jedoch auch ohne operatives Vorgehen erwartet werden kann (Einhorn 1999). Bleibt die Überbrückung der Fraktur bzw. Osteotomie sechs bis acht Monaten aus, spricht man von einer Pseudarthrose (non-union) (Rüter 1999).

Nach Weber und Cech unterscheidet man hypertrophe (reaktive, vitale) und atrophe (inaktive, avitale) Pseudarthrosen (Weber 1976) (Abb. 2). Die reaktiven Pseudarthrosen

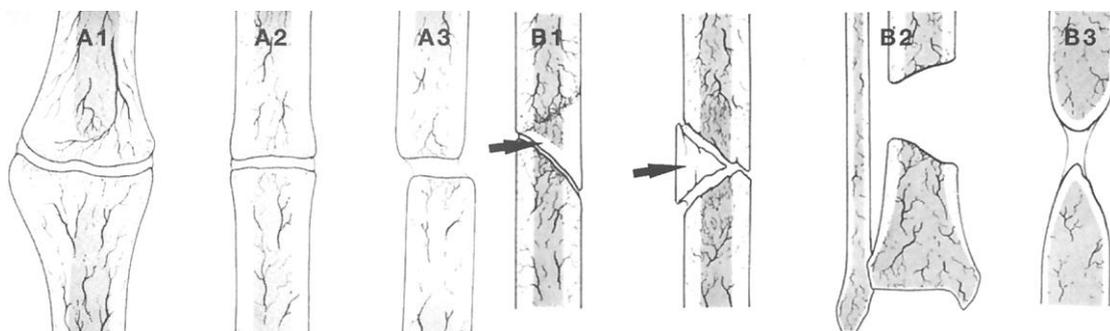


Abb. 2: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Cech 1976.

A1 Hypertrophe kallusreiche Pseudarthrose (Elefantenfuß). A2 Kallusarme Pseudarthrose (Pferdefuß). A3 Oligotrophe, kalluslose Pseudarthrose. B1 Avitale Drehkeilpseudarthrose. B2 Defektpseudarthrose. B3 Atrophe Pseudarthrose

sind durch einen hypertrophen Kallus gekennzeichnet und entstehen meist aufgrund unzureichender Stabilität im Frakturgebiet. Bei der atrophen Pseudarthrose ist vermutlich eine Perfusionsstörung der Knochenfragmente als ursächlich anzusehen.

I.3.1 Ätiologie der beeinträchtigten Knochenheilung

Die Gründe für gestörte Knochenheilung sind vielfältig. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Infektionen, mechanische oder biologische Faktoren. Diese Faktoren können auch kombiniert auftreten und sich gegenseitig beeinflussen.

Im Einzelnen werden folgende mögliche Ursachen für die Entstehung einer Pseudarthrose diskutiert (Runkel 2000):

- *Mangelnde Durchblutung:*

Risikofaktoren für eine schlechte Knochenvascularisierung sind ausgedehnter Weichteilschaden insbesondere ein Kompartment-Syndrom, Stückfrakturen und auch operative Eingriffe am Knochen. Durch die mangelhafte Perfusion kommt es zu Knochennekrosen.

- *Instabilität:*

Ein gewisses Maß an interfragmentärer Bewegung ist für das Voranschreiten der Knochenheilung förderlich. Im Verlauf der Knochenheilung gibt es jedoch auch eine vulnerable Phase, wenn frisch gebildeter Geflechtknochen die Fraktur stabilisiert und der Kallus sich reduziert, in der eine Überlastung zu einer Refraktur führt. Dies tritt auf, wenn ein operierter Knochenbruch vorzeitig stark belastet wird, bei ungenügender Immobilisation im Rahmen einer konservativen Behandlung und bei einer instabilen Osteosynthese.

Ist die Fraktur von vornherein nicht ausreichend fixiert, kann die Entwicklung eines Brückenkallus auch primär ausbleiben.

- *Mangelnder Fragmentkontakt:*

Überschreitet der Knochendefekt eine gewisse Größe, ist der Organismus nicht in der Lage diesen Defekt zu überbrücken. Ein mangelnder Fragmentkontakt kann auch durch die Interposition von Weichteilgewebe oder eine übermäßige Dislokation entstehen.

- *Infektion:*

Eine Infektion wird durch eine bakterielle Kontamination hervorgerufen. Bakterien können entweder durch eine offene Fraktur oder durch eine Operation in den

Frakturspalt gelangen. Tritt eine Knocheninfektion auf, ist der physiologische Heilungsverlauf des Knochens gestört. Es kommt zu einer ausgeprägten Resorption des infizierten Gewebes. In diesem Zusammenhang wird auch neugebildeter Knochen wieder abgebaut. Dadurch kann eine septische Pseudarthrose entstehen.

- *Andere Faktoren:*

Medikamente, vor allem Steroide, Zytostatika und Antikoagulantien, können einen negativen Einfluss auf die Knochenneubildung haben. Des Weiteren beeinflussen allgemeine Faktoren wie Geschlecht, Ernährungszustand und Alter den Heilungsprozess. Erkrankungen, welche die periphere Durchblutung beeinträchtigen, können ebenfalls eine schlechte Knochenheilung bedingen. Hierzu zählen die periphere arterielle Verschlusskrankheit und Diabetes mellitus. Auch ein schlechter Knochenstoffwechsel bei Patienten mit Osteoporose kann eine gestörte Frakturheilung verursachen. Eine langanhaltende Immobilisation bei polytraumatisierten Patienten birgt ebenfalls die Gefahr der Entstehung einer Pseudarthrose.

Des Weiteren könnten auch Gendefekte bzw. genetische Präposition für eine beeinflusste Knochenheilung verantwortlich sein (Dimitriou 2011).

I.3.2 Therapie der beeinträchtigten Knochenheilung

Die Therapie einer Pseudarthrose erfolgt immer operativ. Dabei ist die Kenntnis der Ursache einer Pseudarthrose der Schlüssel zur erfolgreichen Behandlung. Bei hypertrophen Pseudarthrosen erfolgt ein Verfahrenswechsel mit einer Osteosynthese von höherer Stabilität. Bei septischen Pseudarthrosen hat die radikale Infektsanierung Priorität. Bei der Therapie von atrophischen Pseudarthrosen sind die Behandlungskonzepte weitaus komplexer und benötigen oftmals multiple operative Eingriffe. Das Behandlungsziel besteht darin, neues Knochenwachstum zu stimulieren, eine stabile Fixation zu erreichen und verletztes Weichteilgewebe zu rekonstruieren. Heutzutage gilt die autologe Spongiosatransplantation als Goldstandard in der Therapie von atrophischen Pseudarthrosen. Die Spongiosaentnahme erfolgt am Beckenkamm. Dabei kann es zu Komplikationen wie Infektion oder Verletzung von Nerven oder Gefäßen kommen. Die Entstehung von abdominellen oder lumbalen Hernien zählt zu den äußerst seltenen Komplikationen. Die Vorteile der autologen Spongiosatransplantation sind zum einen die geringe Abstoßungsgefahr und zum anderen die natürlichen osteogenen,

osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften des implantierten Knochens. Osteogene Zellen bilden Knochen bzw. differenzieren zu knochenbildenden Zellen. Der Begriff Osteoinduktion beschreibt die Fähigkeit osteogene Zellen anzulocken und/oder eine osteogene Differenzierung von Zellen zu stimulieren. Osteokonduktive Materialien begünstigen die Adhäsion und das Wachstum osteogener Zellen (Giannoudis 2005).

Jedoch ist auch die autologe Spongiosatransplantation keine Garantie für das Zusammenwachsen des Knochens, teilweise wird von Versagensquoten von bis zu 30% berichtet (Bergmann 1989).

Insgesamt geht die komplexe Behandlung von delayed unions und non-unions aufgrund der Häufigkeit der Reinterventionen mit einer erhöhten Komplikationsrate einher. Daher steht die Entwicklung alternativer Therapieansätze zur biologischen Stimulierung der Knochenheilung im Fokus der aktuellen Forschung. Erfolgversprechend erscheint der Einsatz von mittels rekombinanter Gentechnik hergestellten Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und BMP-7 (Friedlaender 2004). Weitere alternative, nichtoperative Behandlungsansätze sind die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWL), Elektrostimulation und niedrigintensive, gepulste Ultraschalltherapie. Voraussetzung für diese Maßnahmen ist jedoch immer eine sachgerechte chirurgische Therapie.

I.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung

Der komplexe Ablauf der Knochenheilung findet auf verschiedenen Ebenen gleichzeitig statt, welche sich gegenseitig beeinflussen. Zum einen handelt es sich wie bereits in Abschnitt I.2 beschrieben um einen zellulären Prozess, zum anderen dirigieren komplizierte molekulare Signalwege den Heilungsablauf. Forschungserkenntnisse der letzten Jahre beweisen die wichtige Rolle von Wachstumsfaktoren in der Regeneration von Knochengewebe. Wachstumsfaktoren sind Proteine, die von Zellen sezerniert werden und auf bestimmte Zellen autokrin, parakrin oder endokrin wirken (Lieberman 2002). Der Anteil der Wachstumsfaktoren im Knochengewebe beträgt weniger als 1% der nicht-kollagenen Proteine. Jedoch üben sie eine wesentliche Kontrollfunktion auf das Knochen- und Knorpelgewebe aus. Am besten untersucht sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die Insulin-like Growth Factors (IGFs), die Transforming Growth Factor Betas (TGF- β s), die Fibroblast Growth Factors (FGFs), die Platelet-derived Growth Factors (PDGFs) und die Vascular Endothelial Growth Factors

(VEGFs). Tabelle 1 stellt eine Übersicht über Herkunft, Wirkungsort und Funktion der oben genannten Wachstumsfaktoren dar.

Tab. 1: Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung (modifiziert nach Dimitriou 2005)

TGF- β

Herkunft: Thrombozyten, Entzündungszellen, Endothel, extrazelluläre Matrix, Chondrozyten, Osteoblasten

Zielzellen: mesenchymale Zellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten
Pleiotropher Wachstumsfaktor, stimuliert die Proliferation von undifferenzierten MSCs, wirkt stark mitogen auf knochenproduzierende Zellen, chemotaktische Wirkung auf Makrophagen
Expression während der gesamten Frakturheilung

BMPs

Herkunft: Osteoprogenitorzellen, MSCs, Osteoblasten, extrazelluläre Knochenmatrix und Chondrozyten

Zielzellen: mesenchymale Zellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten
Differenzierung von undifferenzierten MSCs in Chondrozyten und Osteoblasten, stimulieren die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten, greifen regulierend in die Angiogenese ein (Moreno Miralles 2009)
Zeitlich unterschiedliche Expressionsmuster

PDGF

Herkunft: Thrombozyten, Macrophages, Monocytes, endotheliale Zellen, Osteoblasten

Zielzellen: MSCs, Entzündungszellen und Osteoblasten
Fördern die Zellteilung von mesenchymalen Zellen und Osteoblasten, locken Entzündungszellen und MSCs an
zu sehr frühen Zeitpunkten der Frakturheilung freigesetzt

FGFs

Herkunft: Monozyten, Makrophagen, MSCs, Osteoblasten, Chondrozyten

Zielzellen: MSC, Epithel, Osteoblasten und Chondrozyten
Angiogene und mitogene Wirkung auf mesenchymale und epitheliale Zellen, Osteoblasten, Chondrozyten
a-FGF: bewirkt hauptsächlich eine chondrozytäre Proliferation,
b-FGF: wichtig für die enchondrale Ossifikation, fördert die Knorpelreifung und Knochenresorption
Expression während der frühen Phasen bis zur Osteoblastenformation

IGFs

Herkunft: Knochenmatrix, endotheliale und mesenchymale Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten

Zielzellen: MSCs, endotheliale Zellen, Osteoblasten, Chondrozyten
IGF-I: Rekrutierung und Proliferation von MSCs und Osteoprogenitorzellen, Ausschüttung während der gesamten Frakturheilung
IGF-II: Zellproliferation und Proteinsynthese, Expression während der endochondralen Ossifikation

VEGFs

Herkunft: Osteoblasten, Thrombozyten

Zielzellen: Endothel, Monozyten, Makrophagen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten
Angiogenese, Proliferation von endothelialen Zellen, Migration von Monozyten und Makrophagen (Ylä-Herttuala 2007), Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Carano 2003), Konversion von Knorpel- in Knochengewebe (Devescovi 2008)
Expression während der enchondralen Ossifikation und Knochenentstehung

I.4.1 BMPs

Unter den bisher bekannten Wachstumsfaktoren nehmen die BMPs eine Schlüsselstellung in der Frakturheilung ein. Die Bone morphogenetic proteins wurden 1965 erstmals von Urist entdeckt, als er in seinem tierexperimentellen Versuch herausfand, dass demineralisiertes Knochengewebe ektopes Knochenwachstum induziert (Urist 1965). Die dafür verantwortlichen Proteine wurden allerdings erst mit der Klonierung und rekombinanten Herstellung von humanen BMPs zwei Jahrzehnte später identifiziert (Wozney 1988). Seitdem sind inzwischen über zwanzig verschiedene BMP-Typen bekannt und man weiß um die pleiotropen Effekte dieser Wachstumsfaktoren (Nakase 2006). Sie spielen eine entscheidende Rolle während der embryonalen Organogenese, der Entstehung und Reparatur von Knochen und in der Regulation der Zellfunktion (Chen 2004). Insbesondere Versuche an Knock-out-Mäusen zeigten die essentielle Bedeutung dieser Proteingruppe sowohl für die regelrechte Entwicklung des Skelettsystems als auch zahlreicher anderer lebenswichtiger Organe wie Herz, Lunge und Nieren (Bramlage 2005.).

Ausgenommen von BMP-1, einer Metalloprotease, gehören die BMPs der Transforming-Growth-Factors-Beta-Superfamilie (TGFs- β) an. BMPs sind lösliche Signalproteine mit einem geringen Molekulargewicht. Sie bestehen aus Dimeren, die über Disulfidbrücken gekoppelt sind (Valdes 2009). Sie kommen in einer sehr geringen Konzentration (1 – 2 μ g/kg Kortikalis) im Knochen vor (Wozney 1988). Die Signaltransduktion von BMP erfolgt über die Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes mit zwei BMP-Rezeptoren aus transmembranen Serin/Threonin-Kinasen. Durch die anschließende Phosphorylierung wird die intrazelluläre Signalkaskade initiiert (Rosen 2009). Diese erfolgt entweder über den kanonischen Smad-Signalweg oder über einen Signalweg, der die mitogen activated protein kinase (MAPK) involviert (Senta 2009).

I.4.2 BMP-2

Unter allen BMPs haben BMP-2, BMP-4 und BMP-7, auch Osteogenic Protein 1 (OP-1) genannt, nachweislich das höchste osteoanabole Potential. Sie spielen bei der Frakturheilung eine besondere Rolle und beeinflussen das Zellwachstum und die Knochenneubildung (Bostrom 1998). Der Einfluss der BMPs auf die

Osteoblastendifferenzierung wird in Abb. 3 dargestellt. Bisher stehen BMP-2 als Diboterminal alpha (InductOs[®], Wyeth) und BMP-7 als Eptoterminal alpha (Osigraft[®], Olympus) bei limitierten Indikationen wie der offenen Tibiaschaftfraktur, der Tibiapseudarthrose und der Wirbelsäulenchirurgie der klinischen Anwendung zur Verfügung.

BMP-2 ist ein intensiv erforschter Wachstumsfaktor. Das Glykoprotein ist an der postnatalen Knochenhomöostase beteiligt und seine osteoinduktiven Signale sind essentiell für das natürliche Regenerationsvermögen von Knochen (Rosen 2009).

Die Expression von BMP-2 während der Frakturheilung korreliert mit der Differenzierung von Chondroblasten und Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) (Reddi 1998). In vitro-Experimente zeigten die stimulierende Wirkung von BMP-2 auf die Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen in osteoblastäre Zellen (Katagiri 1990), die Expression von spezifischen Markern der Osteoblastendifferenzierung (Takuwa 1991) und die Migration von Osteoblasten (Lind 1996) (Abb. 4).

Wei et al. verglichen in einem aktuellen Review zur Wirkung von BMP-2 vier randomisierte, kontrollierte Studien, welche insgesamt 609 Patienten einschlossen (Wei 2012). Dabei wurde die Behandlung von akuten offenen Tibiaschaftfrakturen mit intramedullärer Nagelung als Standard of Care (SOC) verglichen mit dem Heilungsverlauf bei zusätzlicher BMP-2 Applikation mittels eines resorbierbaren Kollagenschwamms. Dabei zeigte sich, dass die Rate für sekundäre Interventionen bei der SOC-Gruppe signifikant höher war. Ebenfalls kam es ohne BMP-2 häufiger zum Behandlungsversagen. In den Punkten Infektionsrate, Implantatversagen und postoperatives Schmerzlevel hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen BMP und SOC gefunden.

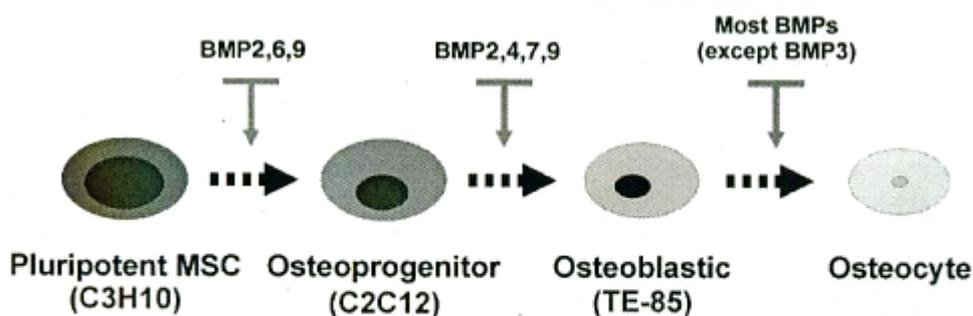


Abb. 3: Die BMPs und die Induktion der Osteoblastendifferenzierung

(Abbildung entnommen aus: Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am 2003;85-A(8):1544-1552)

Im Cochrane Review von Garrison et al. wird die Effektivität von BMP bei Erwachsenen anhand der aktuellen Studienlage kontrovers ausgeleuchtet (Garrison 2010). Kritisch begutachtet werden dabei unausgewogene Randomisierung, uneinheitliche Heilungskriterien sowie auch die Finanzierung vieler Studien durch die Industrie. Die Autoren des Reviews kommen zu dem Schluss, dass der Einsatz von BMP-2 bei sehr schwerwiegenden offenen Tibiaschaftfrakturen vor allem ökonomische Vorteile biete durch eine reduzierte Dauer der Arbeitsunfähigkeit. Bei Pseudarthrosen hingegen sei der Nutzen von BMP weiterhin unklar.

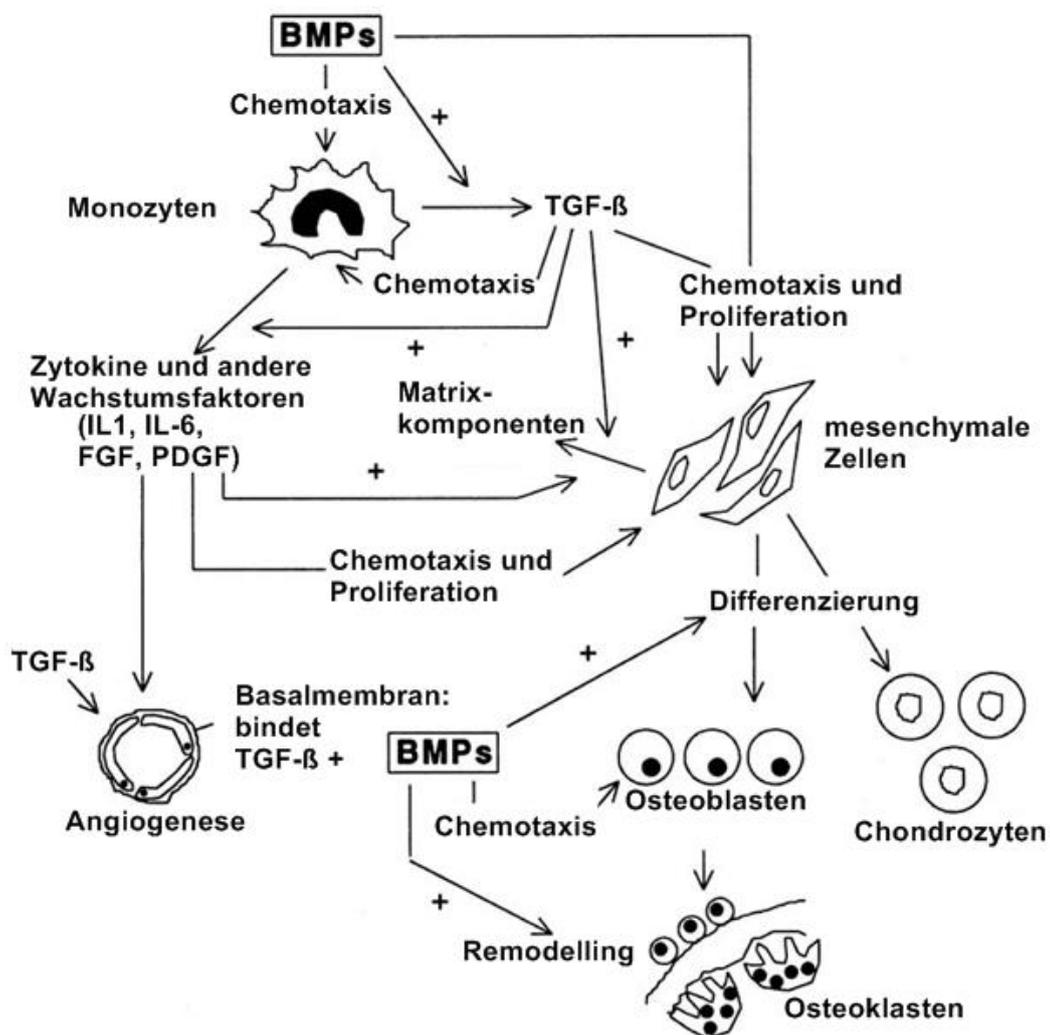


Abb. 4: Schematische Darstellung der Rolle von BMPs in der Knochenheilung.

Eine typische Abfolge von Ereignissen kann bei der durch BMPs induzierten enchondralen Ossifikation beobachtet werden: Rekrutierung und Proliferation von Monozyten und mesenchymalen Zellen, Differenzierung in Chondrozyten, Kalzifikation der Knorpelmatrix, vaskuläre Invasion, Differenzierung von Osteoblasten und Remodelling des neugeformten Knochens.

+ = stimulierender Effekt

(Abbildung entnommen aus Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. J Bone Joint Surg Am. 2005 Jun;87(6):1367-78.)

Zu den Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit BMP-2 auftreten können, zählen lokale Erytheme, Schwellung, Pyrexie und ektopes Knochenwachstum (Garrison 2010). Von immunologischen Reaktionen wird sehr selten berichtet (De Biase 2005). Der therapeutische Einsatz von BMP-2 gilt als sicher und in Untersuchungen, die sich mit der Biokompatibilität von BMP-2 befassten, zeigte sich kein Anhalt für Zytotoxizität (Poynton 2002). Kontraindiziert ist die Anwendung von BMP-2 bei Kindern, Patienten mit Autoimmundefekten, Schwangerschaft und Immunsuppression (Gautschi 2007). Einige Studien berichten, dass BMP einen positiven Effekt auf die Tumorgenese oder Metastasierung habe (Dai 2005, Raida 2005). In anderen Publikationen wird ein antiproliferativer Effekt von BMPs auf Karzinomwachstum beschrieben (Soda 1998, Piccirillo 2006). Obwohl keine direkte Assoziation zwischen BMPs und Tumorgenese nachweisbar ist, stellt eine vorbestehende Tumorerkrankung eine relative Kontraindikation für die Anwendung von BMP dar (Thawani 2010).

I.4.3 Applikationsformen von BMP-2

Da die BMPs schnell in vivo metabolisiert werden (Halbwertszeit von circa sieben Minuten bei Primaten (Poynton 2002)), müssen sie in ein Trägermaterial eingearbeitet werden. Ein optimaler Carrier für Wachstumsfaktoren in der Frakturheilung sollte biokompatibel, biodegradierbar und osteokonduktiv sein (Termaat 2005). Das für die BMPs zurzeit zugelassene Trägermaterial ist Rinderkollagen. In zahlreichen tierexperimentellen Studien wurden auch alternative Carrier wie demineralisierte Knochenmatrix, Hydroxylapatit oder biodegradierbare Polymere mit guten Ergebnissen getestet (Gautschi 2007).

Eine Herausforderung an die Forschung ist die Kombination von Osteosynthese und Trägermaterial. Im Fokus stehen verschiedene Arten der Beschichtung von Osteosynthesematerialien mit natürlich abbaubaren Polymeren. Die Vorteile dieser Methode sind (a) die lokale und kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors, (b) die sichere Anwendung aufgrund der kompletten Absorption und Metabolisierung des Polymers und (c) die Kombination einer etablierten Osteosynthese mit einem Trägermaterial für bioaktive Substanzen (Wildemann 2005). Das kalte Beschichtungsverfahren mit dem Polymer Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) kann diesen Ansprüchen gerecht werden. Die Beschichtung orthopädischer Implantate mit PDLLA ist mechanisch stabil

und hält sogar einer intramedullären Nagelung stand (Schmidmaier 2000). Der Wachstumsfaktor wird von der Oberfläche des Implantats kontinuierlich freigesetzt. Es ist nicht notwendig, die Fraktur zu eröffnen. Somit können Komplikationen, die mit dem Öffnen der Fraktur assoziiert sind, vermieden werden. Der Einsatz von PDLLA in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 zeigt vielversprechende Ergebnisse in tierexperimentellen Studien. Schmidmaier et al. demonstrierten 2002 in einem standardisierten Frakturmodell an der Ratte, dass eine PDLLA-Beschichtung als Trägermaterial für BMP-2 (5% [w/w]) auf einem Titan-Implantat die Frakturheilung signifikant beschleunigt und für eine höhere biomechanische Stabilität des frakturierten Knochens sorgt (Schmidmaier 2002).

I.5 Tiermodell für beeinträchtigte Knochenheilung

Die Voraussetzung für die Erprobung neuer Therapieansätze ist ein geeignetes Tiermodell für eine verzögerte Knochenheilung. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um eine beeinträchtigte Knochenheilung im Tiermodell zu erzeugen: instabile Fixierung (Probst 1999), unterschiedlich große Knochendefekte (Harrison 2003), Entfernung des Periosts oder des Knochenmarks (Kaspar 2008). All diese Methoden stellen jedoch keine typisch klinischen Situationen für die Entstehung von Pseudarthrosen oder verzögerter Knochenheilung dar.

Kratzel et al. zeigten in ihrer Studie an Ratten, dass eine Osteotomie der Tibia, stabilisiert mit einem intramedullären Titan-Kirschner-Draht, in einer verzögerten Knochenheilung resultierte (Kratzel 2008). Selbst nach 84 Tagen war keine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts erfolgt. Im Gegensatz dazu war in einem vorangegangenen Versuch die geschlossene Fraktur einer Rattentibia ebenfalls mit einem Kirschner-Draht stabilisiert worden und es kam zur knöchernen Konsolidierung (Schmidmaier 2004). Somit kam es aufgrund der Durchführung einer Osteotomie am offenen Schienbein zur Beeinträchtigung der Knochenheilung. Dieses Tiermodell erscheint geeignet um Therapieansätze für verzögerte Knochenheilung zu testen, welche weder durch Instabilität noch durch massive Manipulation des umliegenden Weichteilgewebes wie der Entfernung des Periosts entsteht.

I.6 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die lokale Wirkung von BMP-2 (5% [w/w]), das von Poly(D, L –Laktid) beschichteten Implantaten freigesetzt wurde, auf ein Osteotomie-Modell mit verzögerter Knochenheilung an der Ratte zu untersuchen (Kratzel 2008). Im Untersuchungszeitraum von insgesamt 84 Tagen wurden zu festgelegten Zeitpunkten sowohl radiologische, biomechanische als auch histologische und histomorphometrische Methoden angewandt um die Progression der Knochenheilung und gegebenenfalls Nebenwirkungen des Medikaments und der Applikationsart zu evaluieren.

I.7 Hypothese

Das BMP-2 hat bei lokaler Applikation einen stimulierenden Einfluss auf die Heilung der osteotomierten Tibia bei Ratten, sodass eine komplette Knochenheilung erzielt werden kann.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Studiendesign

Um die Wirkung von BMP-2-beschichteten Drähten auf die beeinträchtigte Knochenheilung zu untersuchen, wurde ein standardisiertes Osteotomie-Modell an der Ratte angewendet. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere der postoperativen Auswertmethode zugeordnet.

Bei allen Tieren wurde in einer Operation unter Vollnarkose eine Osteotomie der rechten Tibia durchgeführt. Diese wurde mit einem Titan-Kirschner-Draht versorgt, welcher mit einem 5 % BMP-2-Gemisch (50 µg) beschichtet war. Die postoperative Versorgung erfolgte bei allen Tieren gleich. Zu festgelegten Zeitpunkten fanden radiologische Kontrollen mittels konventionellem Röntgen, Gewichtsmessungen und die Tötung der Tiere für weitere Untersuchungen statt.

Je sechs Tiere pro Gruppe wurden an den Tagen 28, 42 und 84 getötet und die Tibiae biomechanisch getestet. Bei weiteren sechs Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt (28 - 84 Tage) wurden die Tibia post mortem entnommen und zur histologischen Auswertung in Polymethymethacrylat (PMMA) eingebettet. Die Tibiae der Tiere, die nach fünf und zehn Tagen getötet wurden, wurden für die histologischen und immunhistochemischen Auswertungen in Paraffin eingebettet (sechs Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt).

Tab. 2: Versuchsaufbau der Kontrollgruppe und der BMP-Gruppe

	Röntgen	IHC	Biomechanik	Histologie- PMMA	Anzahl der Tiere
Kontrolle PDLLA	0, 5, 10, 28, 42, 84 d	5, 10 d	28, 42, 84 d	28, 42, 84 d	48
Therapie PDLLA + BMP-2	0, 5, 10, 28, 42, 84 d	5, 10 d	28, 42, 84 d	28, 42, 84 d	48

Als Kontrollgruppe zur BMP-2-Gruppe dienten Tiere, die im Rahmen der Etablierung des Osteotomie-Modells nach Kratzel et al. operiert wurden. Analog dem vorliegenden Studiendesign führte Camilla Bergmann im Rahmen ihrer Dissertation radiologische, biomechanische und histologische Untersuchungen an diesen Tieren durch (Tab. 2). Dabei war der Draht mit Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) beschichtet, welches in der BMP-Gruppe ebenfalls als Trägersubstanz für das BMP-2 verwendet wurde. Durch das

Miteinbeziehen der bereits operierten Tiere als Kontrollgruppe konnte die Anzahl der Tiere für den Versuch reduziert werden.

Als Versuchstiere dienten fünf bis sechs Monate alte weibliche Sprague Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 bis 280 g (Harlan Winkelmann GmbH Borchon, Deutschland). Die Haltung der Ratten sowie alle Operationen und Untersuchungen erfolgten in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin. Das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin hat das Versuchsvorhaben unter der Nummer G0347/06 genehmigt.

II.1.1 Osteotomie-Modell

Um den lokalen Einfluss von BMP-2 auf die beeinträchtigte Knochenheilung zu untersuchen, wurde ein etabliertes Osteotomie-Modell angewandt (Kratzel 2008). Im Rahmen dieses Modells wurde am mittleren Tibiaschaft der Ratte mit einer Diamant-Drehscheibe eine Osteotomie durchgeführt. Die Fibula wurde manuell frakturiert. Zur Stabilisierung erfolgte anschließend eine intramedulläre Nagelung mittels eines Titan-Kirschner-Drahts, welcher über die Osteotomie hinaus in den vorgebohrten Markraum der Tibia vorgeschoben wurde.

II.1.2 Beschichtete Titan-Kirschner-Drähte

Zur Versorgung der Tibia-Osteotomie wurden in allen Gruppen als intramedulläre Implantate Titan-Kirschner-Drähte mit einem Durchmesser von 1,0 mm eingesetzt. Diese dienten neben ihrer Funktion als Stabilisatoren der Osteotomie auch als Wirkstoffapplikatoren für die Wirksubstanz BMP-2.

Die Titan-Kirschner-Drähte wurden mittels eines kalten Beschichtungsverfahrens, welches steril unter einer Laminar-Flow-Bank durchgeführt wurde, beschichtet. Zunächst wurden 100 mg PDLLA in 1,5 ml Ethylacetat gelöst und filtriert. Davon wurden 600 µl mit 2 mg lyophilisiertem rhBMP-2 vermischt, um ein 5%iges BMP-2-Gemisch herzustellen. Jeder Draht wurde zweimal steril in das Gemisch getaucht. Zwischen den Tauchvorgängen wurde der Draht zum Trocknen etwa 10 Sekunden gedreht und geschwenkt. Danach wurden die Drähte circa eine Stunde unter der Bank getrocknet und in sterile Tüten doppelt verpackt und verschweißt. Die beschichteten Drähte wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Bei einer angenommenen Menge von 1 mg Beschichtung auf dem Draht ergab sich eine Menge von 50 µg BMP-2 pro Draht.

II.2 Der operative Eingriff

Um die Versuchstiere schonend zu operieren und eine schmerzfreie Osteotomie zu gewährleisten, wurden die Tiere mit einer Kombination aus Inhalations- und Intrapertonealnarkose anästhesiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte inhalativ in einer verschließbaren Plastikbox mit einem Gemisch aus Sauerstoff (0,4 l/min), Lachgas (N₂O) (0,4 l/min) und Isofluran (3 Vol.%). Durch die nachfolgende intraperitoneale Applikation eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (0,8 mg/ kg KG) und Xylacinhydrochlorid (0,6 mg/ kg KG) wurde die Anästhesie aufrechterhalten.

Die Kombinationsnarkose garantierte durch eine schonende und sichere Sedation, Relaxation und Analgesie von circa 60 Minuten die komplikationsfreie Operation.

Mit ausreichender Narkosetiefe wurde das rechte Hinterbein der Tiere mit einer elektrischen Schermaschine rasiert und verbliebene Haare mittels Enthaarungscreme entfernt. Um der Austrocknung der Augen während der Narkose vorzubeugen, wurden die Augen mit Panthenol-Augensalbe behandelt. Anschließend wurden die Tiere gewogen und die Schwänze der Tiere zur Identifizierung verschiedenfarbig markiert. Abschließend wurde der zu operierende rechte Hinterlauf sorgfältig desinfiziert.

Im Anschluss an die Vorbereitung der Versuchstiere und nach wiederholter Sicherstellung der erforderlichen Narkosetiefe wurde die Operation unter sterilen Bedingungen begonnen.

Um den Markkanal der Tibia zu eröffnen, erfolgte ein 0,5 cm langer Hautschnitt medial entlang der Tuberositas tibiae. Dann wurde mit einem unbeschichteten Stahl-Kirschner-Draht (Durchmesser 1,0 mm) in das Cavum medullare behutsam mit leichten Drehbewegungen vorgebohrt. Dieser Vorgang erfolgte unter visueller Kontrolle mithilfe des Bildverstärkers. Anschließend wurde der Kirschner-Draht wieder entfernt und die Osteotomie konnte erfolgen. Dazu wurde eine zweite Hautinzision auf Höhe des mittleren Tibiaschafts vorgenommen. Um den Weichteilschaden durch die Osteotomie zu minimieren, wurde der Knochen behutsam freipräpariert. Hierbei wurde das umliegende Muskelgewebe stumpf vom Knochen gelöst und anschließend mit Haken gehalten. Dann wurde die Osteotomie mit einer Diamant-Drehscheibe durchgeführt. Während des Vorgangs wurde der Knochen zur Kühlung der entstandenen Hitze mit

sterilem, destilliertem Wasser beträufelt. Nach wiederholter Spülung des Osteotomiegebiets wurde die Fibula auf gleicher Höhe manuell frakturiert.

Anschließend erfolgte eine Stabilisation des osteotomierten Knochens mit dem beschichteten Titan-Kirschner-Draht. Der korrekte Sitz des Drahtes wurde intraoperativ mit dem Röntgen-Bogen überprüft.

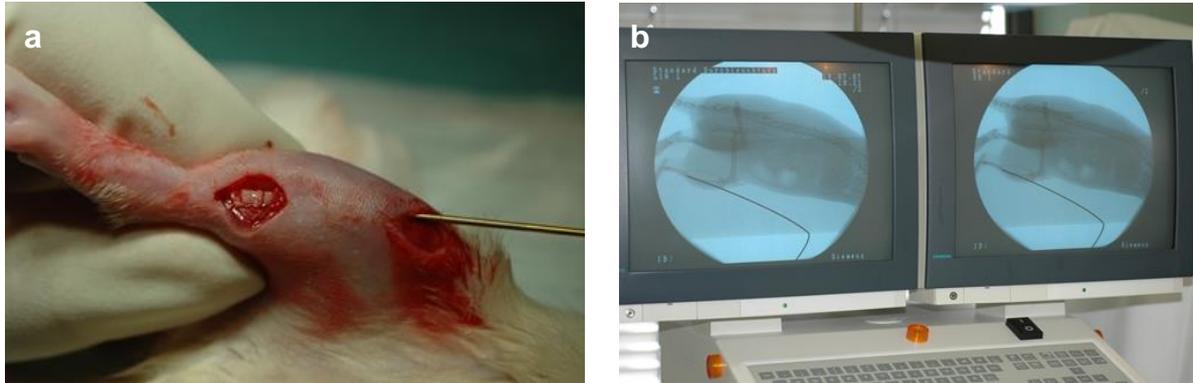


Abb. 5: Intraoperative Darstellung der Osteotomie

- (a) Stabilisation mit dem BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Draht
- (b) Durchleuchtung während der OP zur Kontrolle der Drahtposition intramedullär

Abschließend erfolgte eine sorgsame Wunddesinfektion. Die Wunden wurden mittels Naht in Einzelknopftechnik verschlossen. Auf die verschlossenen Wunden wurde eine Gentamycin-Salbe als Prophylaxe gegen Infektionen aufgetragen. Als Schmerztherapie erhielten die Tiere noch vor dem Erwachen aus der Narkose Buprenorphin (0,05 mg/ kg KG) als subkutane Injektion.

Die Tiere wurden nach der Operation in Einzelkäfige gelegt. Dies sollte verhindern, dass sich die Tiere gegenseitig im Wundbereich annagten oder die Naht öffneten. In der Umgebung der Käfige war eine Wärmelampe aufgestellt, um eine schonende Aufwachphase der Tiere sicherzustellen. Während der postoperativen Aufwachphase wurden die Tiere fortlaufend überwacht.

II.3 Postoperative klinische und radiologische Untersuchungen

Postoperative Nachsorge

In den ersten drei postoperativen Tagen wurden die Tiere zweimal täglich analgetisch mit Buprenorphin (0,05 mg/ kg KG s.c.) behandelt. Des Weiteren wurde der Wundbereich inspiziert, gegebenenfalls gesäubert, desinfiziert und mit Gentamycin-Salbe behandelt. Diese Wundpflege wurde fünf Tage nach der Operation täglich

durchgeführt. Stellte sich nach diesem Zeitraum der Nahtbereich reizlos dar, wurden die Tiere in größere Käfige zusammengesetzt.

Im weiteren Verlauf wurde auf die Aktivität sowie das Fress- und Trinkverhalten der Tiere geachtet. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Belastung des operierten Hinterlaufs gelegt.

Gewichtskontrolle

Die im postoperativen Verlauf notwendigen Untersuchungen (Wiegen und Röntgen) erfolgten unter inhalativer Kurznarkose mit dem in Absatz II.2 genannten Sauerstoff-Lachgas-Isofluran-Gemisch in der Narkosebox. Die Gewichtskontrolle der Tiere fand postoperativ nach 28, 42 und 84 Tagen statt.

Radiologische Kontrolle

Die radiologischen Kontrollen wurden regelmäßig anhand des in Tabelle 2 gezeigten Schemas durchgeführt. Dabei handelte es sich um konventionelle Röntgenaufnahmen, die in zwei Ebenen (lateral und posterior-anterior) angefertigt wurden (Abb. 2). Um das Röntgen durchzuführen, wurden die Tiere nach Inhalationsanästhesie in Bauchlage auf die digitalen Röntgenplatten gelegt und in erforderlicher Position mit Pflaster fixiert. Für die Röntgenbilder im posterior-anterioren Strahlengang wurde der Hinterlauf dorsal

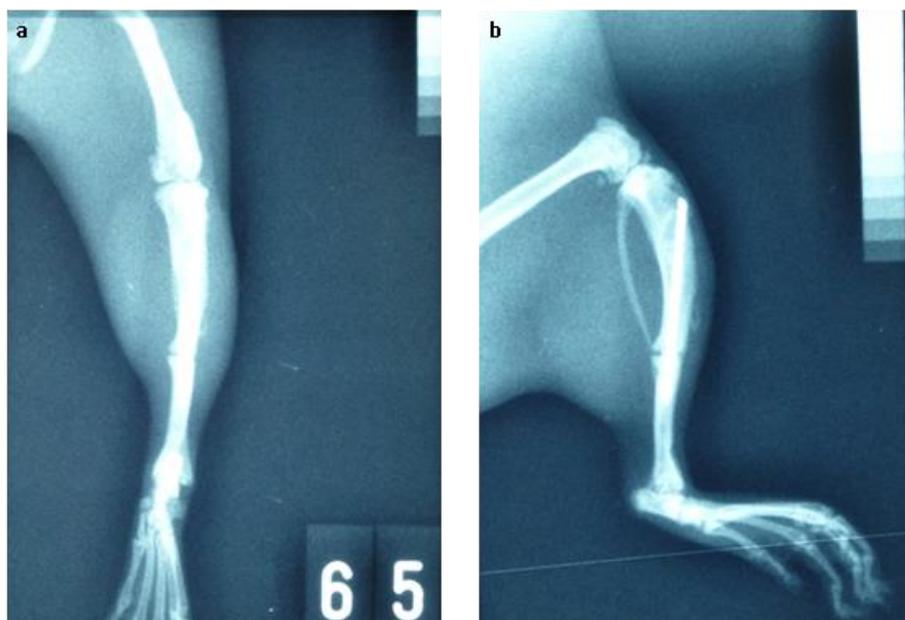


Abb. 6: Konventionelle Röntgenaufnahmen im Verlauf

Exemplarische Darstellung der Röntgenaufnahme eines Tieres der BMP-Gruppe nach 42 Tagen; **(a)**: im posterior-anterioren Strahlengang; **(b)**: im lateralen Strahlengang

extendiert, für die lateralen Röntgenaufnahmen wurde das Bein abduziert und der Fuß seitlich auf der Röntgenplatte fixiert. Um die richtige Zuordnung der Röntgenbilder sicherzustellen, wurden röntgendichte Zahlen auf die Röntgenplatte gelegt. Die Einstellung für die Röntgenaufnahme betrug 52 kV Strahlenhärte und 1,8 mAs Belichtungszeit. Der Abstand zwischen der Röntgenplatte und dem Röntgengerät betrug 100 cm.

Zur Beurteilung des erreichten Heilungsstadiums nach der Osteotomie wurden die Aufnahmen mittels eines standardisierten Röntgenscores ausgewertet, wobei die Auswertung von zwei unabhängigen Beobachtern vorgenommen wurde (Tab. 3). Das Ergebnis der Auszählung ließ einen Rückschluss auf den Grad der Heilung in den einzelnen Gruppen zu. Je höher der Anteil von Tieren, die der Kategorie C zugeordnet wurden, desto weiter war die Heilung vorangeschritten.

Tab. 3: Einteilung des Heilungsstadium nach dem Röntgenscore

Kategorie	Kriterien
A	Keine Überbrückung der Kortizes
B	Inkomplette Überbrückung einer bis drei Kortizes
C	Komplette Überbrückung aller vier Kortizes

Tötung und Präparatentnahme

Die Versuchstiere wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit an Tag 5, 10, 28, 42 oder 84 nach der Osteotomie der Tötung zugeführt. Dazu wurden die Tiere mittels Kombinationsanästhesie tief narkotisiert, siehe auch Abschnitt II.2, und im Anschluss daran durch intrakardiale Injektion von 2 ml 14,9%iger Kaliumchloridlösung getötet. Nach Feststellung des sicher eingetretenen Todes erfolgte die Entnahme der Knochenpräparate. Der Hinterlauf wurde zuerst vollständig vom Situs abgetrennt. Dann wurden Fell und Haut der Tibia sowie darunter liegende Muskeln und Sehnen vorsichtig durchtrennt. Die weitere Präparation erfolgte unter sorgfältiger Schonung des Knochens, insbesondere des kallösen Bereichs. Nach Exartikulation im Articulationus wurden Tibia und Fibula vom Femur abgezwickelt, danach Articulation talocruralis und Fibula reseziert. Der Kirschner-Draht wurde mittels einer Faszange behutsam aus dem Knochen herausgelöst.

Für die biomechanischen Testungen wurde neben der osteotomierten, rechten Tibia auch die gesunde, kontralaterale Tibia entnommen. Die frei präparierten Knochen wurden umgehend in mit Kochsalzlösung getränkte Kompressen eingewickelt, um die

Qualität der Präparate nicht durch Austrocknungsprozesse zu beeinträchtigen. Dann wurden die Knochenpräparate unverzüglich der biomechanischen Testung zugeführt. Die histologisch zu untersuchenden Tibiae wurden nach der Präparation sofort in Fixierlösung gelegt.

Bakteriologische Untersuchung

Post mortem wurden von einigen Tieren sowohl vom Draht als auch vom Osteotomie umliegenden Kallusgewebe Abstriche entnommen. Diese Abstriche wurden in ein externes mikrobiologisches Labor eingeschickt, wo nach 48 Stunden Inkubation das Bakterienwachstum analysiert wurde. Dabei wurde nach aeroben und anaeroben Bakterien gescreent.

II.4 Biomechanische Testung

Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die präparierten Tibiae in Gussformen eingebettet. In Höhe des Tibiaplateaus wurde die Tibia in einem Ständer mittels Haltevorrichtung fixiert (Abb. 7). Das distale Ende der Tibia hing bis in die darunter platzierte Gussform. Durch drei bewegliche Ebenen des Ständers wurde die Tibia senkrecht und zentriert ausgerichtet. Mittels Visierhilfe wurde diese Ausrichtung sichergestellt. Die Gussformen wurden für das Einbetten der Tibiae mit dem schnell

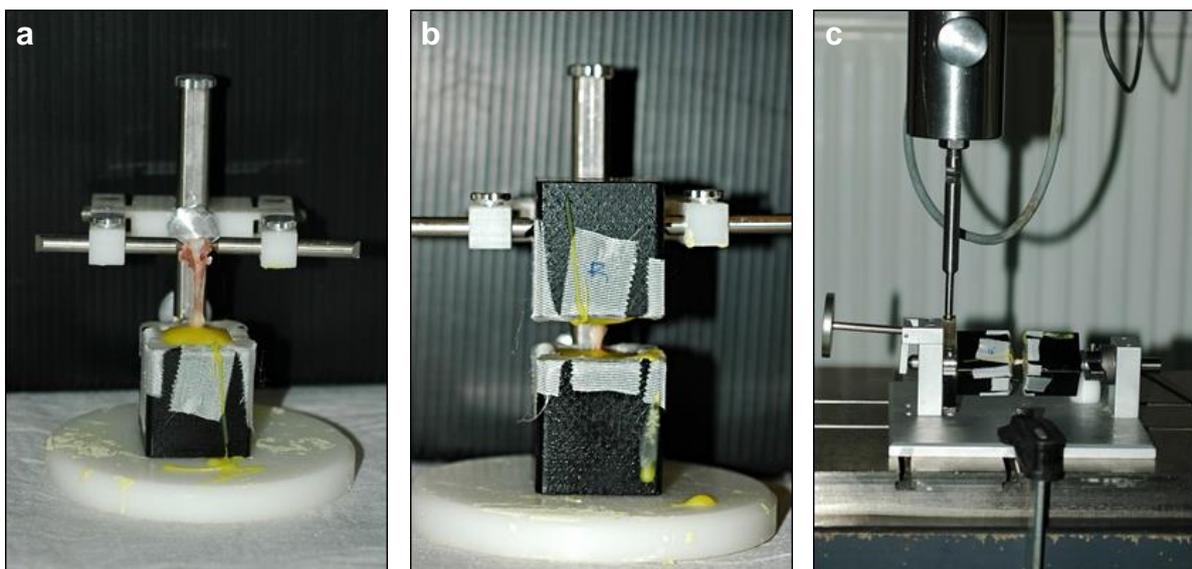


Abb. 7: Einbetten der Tibia

Zunächst wurde die Tibia mit Technovit 3040 von distal in ein Förmchen eingebettet (a), dann erfolgte das Einbetten des proximalen Knochenendes (b). Anschließend wurden die Tibiae für die torsionale Testung in die Zwick eingespannt (c).

aushärtenden Einbettzement Technovit 3040 gefüllt. Innerhalb der 20-minütigen Aushärtung des Einbettzements wurde die Tibia zum Schutz vor Austrocknung fortlaufend mit Kochsalzlösung befeuchtet. Nachdem der Einbettzement ausgehärtet war, wurde die Gussform mit dem eingebetteten distalen Ende der Tibia im Ständer eingespannt. Dann erfolgte die Einbettung des proximalen Tibiaanteils. Dabei wurde ein festgelegter Abstand von 1,8 cm zwischen den Gussformen durch einen Messschieber kontrolliert.

Die biomechanische Testung der Knochen erfolgte mit der Materialprüfmaschine Zwick. Vor Beginn des Testungsvorgangs wurden die Tibiae in einer Torsionsmaschine für Kleintierknochen befestigt (Abb. 8). Die Torsionsmaschine war mit einem Gewicht verbunden, das die axiale Vorlast der Tibia in Höhe von einem Newton bewirkte. Die Vorlast stellte gleichmäßige Druckverhältnisse über die gesamte Tibia sicher. So wurden Belastungen durch Zug begrenzt, die bei torsionalen Testungen entstehen. Der Testungsvorgang begann, wenn die Zwick in konstanter Geschwindigkeit herunterlief. Über den Hebelarm an der Torsionsmaschine wurde die Krafteinwirkung der Zwick aufgenommen, auf die Torsionsmaschine übertragen und in eine Drehbewegung transformiert. Die induzierte Torsion wurde durch die Kraftmessdose aufgenommen.

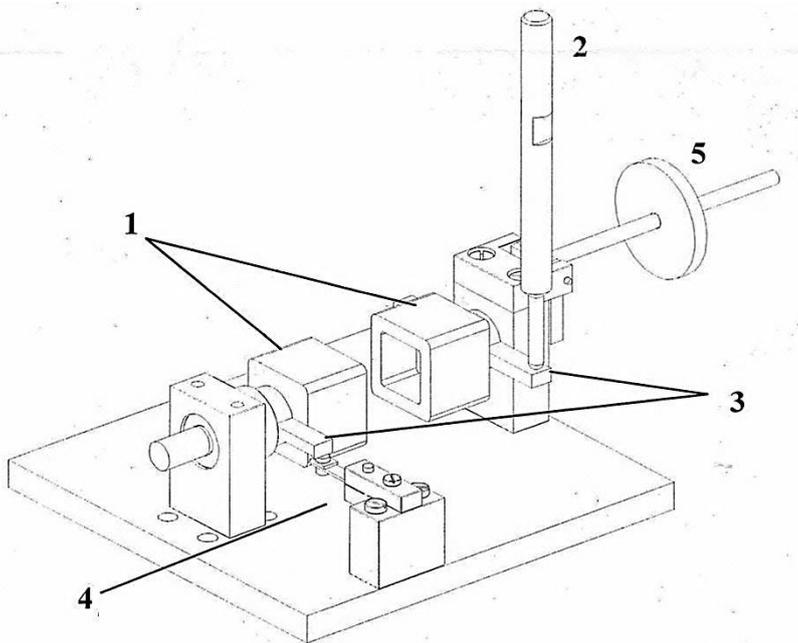


Abb. 8: Schematische Darstellung der Torsionstestmaschine (Zwick)

Der in Formen (1) eingebettete Knochen wird in der Testmaschine fixiert. Mit einer Vorlast von 1N (5) wird der Knochen vorbelastet. Die Prüfmachine (2) erzeugt eine lineare Bewegung, die über den Hebelarm (3) in eine Drehbewegung umgewandelt wird. Das erzeugte Torsionsmoment wird durch eine Kraftmessdose (4) gemessen.

Der Messkraftverstärker leitete die Daten an einen Computer, die zur Weiterverarbeitung in der Software Catman 32 als ASCII mit einer Header-Datei gespeichert wurden. Hielt die Tibia dem Torsionsmoment nicht mehr stand, stoppte die Zwick den Prüfvorgang bei einem Widerstandsverlust von acht Prozent.

Zur Auswertung der biomechanischen Untersuchungen wurden die Parameter torsionale Steifigkeit und maximales Drehmoment herangezogen. Diese wurden zuerst getrennt für die osteotomierte Tibia und für die gesunde, kontralaterale Tibia ermittelt und nachfolgend als osteotomiert / kontralateral gesund x 100 dargestellt.

Die nach der Testung mittels Zwick gespeicherten Rohdaten, pro Testung etwa 5.000 bis 10.000 Messwerte, wurden zur weiteren Auswertung in die Software Excel übertragen und graphisch dargestellt. Auf der Y-Achse wurde das Drehmoment in [Nmm] und auf der X-Achse die Winkeländerung der Tibia in [°] aufgetragen. Die Steigung des erstellten Graphen [$m = Y_b - Y_a / X_b - X_a$] definierte die zu bestimmende torsionale Steifigkeit, und der höchste Punkt des Graphen entsprach dem maximalen Drehmoment. Für die exakte Ermittlung der Steifigkeit war es notwendig, die Daten in eine Arbeitshilfe mit einer integrierten Ausgleichsgeraden zu übertragen. Die torsionale Steifigkeit wurde bestimmt, indem die Ausgleichsgerade exakt am linear ansteigenden ersten Drittel des Graphen angelegt wurde.

Aus der Arbeitshilfe wurde auch der Wert für das maximale Drehmoment abgelesen (Abb. 9).

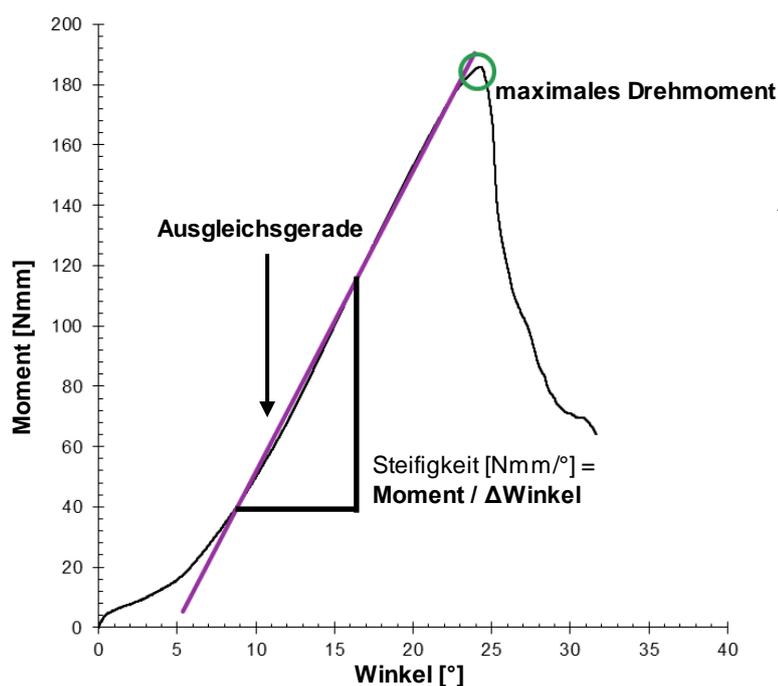


Abb. 9: Exemplarischer Verlauf der Belastungs-Deformitätskurve

BMP-Gruppe, 42 Tage, rechte Tibia. Ausgleichsgerade (violett) zur Ermittlung der Steifigkeit, der Kreis markiert das maximale Drehmoment.

II.5 Histologische Untersuchungen

II.5.1 Fertigung der Knochenschnitte

Knochenaufbereitung und Herstellung der histologischen Schnitte der Gruppen fünf und zehn Tage

Die Tibiae, welche fünf und zehn Tage nach der Osteotomie entnommen wurden, zur Fixierung lagerten zwei bis drei Tage in Formalin. Im Anschluss erfolgte eine zweiwöchige Dekalzifizierung der Knochen mit Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA).

Um die Knochen in Paraffin einbetten zu können, mussten diese zuvor entwässert werden. Dazu durchliefen sie eine ansteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %) mit einer Verweildauer von einer Woche pro Stufe. Anschließend wurde der Alkohol durch das Intermedium Xylol ersetzt. Der entwässerte Knochen wurde dann in einer Einbettkassette mit heißem Paraffinwachs übergossen. Durch Kühlung erstarrte das Wachs zu einem Paraffinblock, der geschnitten werden konnte.

Zunächst wurde der Paraffinblock in das Rotationsmikrotom eingespannt und so lange angeschnitten bis die gewünschte Schnittebene im Knochen erreicht war und sowohl der Osteotomiespalt samt Kallus als auch der gesamte Markraum der Tibia sichtbar war. Zur Verbesserung der Schneidequalität war während des gesamten Vorgangs auf ein wiederholtes Kühlen der Paraffin-Blöcke zu achten. Zu diesem Zweck wurden sie zwischen den Schneidevorgängen auf mit destilliertem Wasser befeuchteter Aluminium-Folie über einem Eisblock gekühlt. Nach Erreichen der Zielebene wurden zehn Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt. Der auf das Messer geschobene Gewebeschnitt wurde mit einem angefeuchteten Pinsel aufgehoben und in ein Warmwasserbad übertragen. Dort streckte sich der Schnitt und konnte faltenfrei auf bereits mit der Tiernummer gekennzeichnete Objektträger aufgezogen werden. Zur Trocknung und besseren Haftung der Gewebsschnitte am Objektträger wurden sie bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

Knochenaufbereitung und Herstellung der histologischen Schnitte der Gruppen 28, 42 und 84 Tage

Die Knochenaufbereitung für die histologischen Untersuchungen erfolgte nach einem standardisierten Verfahren mit Fixierung, Entwässerung, Entfettung, Präinfiltration, Infiltration und abschließender Einbettung.

Nach der Knochenpräparation verblieben die Tibiae zwei Tage in 10 % gepufferter Formaldehydlösung auf einem Schüttler. Somit konnte die Fixierlösung gleichmäßig in das Gewebe eindringen. Die Präparate wurden anschließend circa eine Stunde mit Leitungswasser gespült und danach durch eine ansteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100 %) für jeweils eine Woche und anschließend nochmals zwei Wochen in absolutem Alkohol entwässert. Abschließend wurden die Knochenpräparate mit dem Intermedium Xylol über vier Stunden entfettet.

Als Medium für die Präinfiltration, Infiltration und Einbettung wurde Technovit 9100, ein Kunststoff auf der Basis von Methylmethacrylat zur Herstellung von histologischen Schnitten in Hartschnitt-Technik, verwendet. Technovit 9100 wird potenziell als gesundheitsgefährdend eingestuft. Deshalb wurde mit diesem Kunststoff nur unter dem Abzug gearbeitet und die Lösungen in speziellen Kanistern entsorgt.

Die mit Xylol entfetteten Knochenpräparate wurden für eine Woche bei Raumtemperatur mit Technovit präinfiltriert. Dann erfolgte die siebentägige Infiltration in Technovit bei einer Temperatur von 4 °C. Für das abschließende Einbetten wurde ein Gemisch aus neun Volumenanteilen einer Stammlösung A und einem Volumenanteil einer Stammlösung B verwendet. Zum Einbetten wurden die Tibiae zentriert in verschließbare Plastikgefäße gelegt, langsam bis zum oberen Rand mit dem Stammlösungsgemisch übergossen und luftdicht verschlossen im Kühlschrank für mindestens 24 Stunden aufbewahrt. Nach Aushärtung des Kunststoffes wurden die Blöcke zum vereinfachten Einspannen im Mikrotom mit Technovit 3040 aufgebockt.

Vor Beginn des Schneidevorgangs wurden die Blöcke fest im Mikrotom eingespannt und in senkrechter Position zum Schneidemesser ausgerichtet. Dann wurden die unentkalkten Kunststoff-Knochenpräparate mit dem elektrischen Hartmikrotom angeschnitten bis der Knochen an der Oberfläche deutlich sichtbar wurde. Das Schneiden wurde bis zum Erreichen der gewünschten Schnittebene fortgesetzt, welche durch die gleichzeitige Darstellung des peri- und endostalen Kallusgewebes, des Osteotomiespaltes sowie des Knochenmarkraums definiert war. Nach Erreichen der gewünschten Zielebene wurden nacheinander zehn Schnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm behutsam vom Block abgenommen und auf mit Alkohol benetzte Objektträger gelegt.

Zur Sicherstellung einer guten Präparatqualität wurden unregelmäßige Anteile im Schnittpräparat mit einem feinen Pinsel korrigiert und zusätzlich Streckflüssigkeit auf die

Schnittpräparate pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte mit spezieller Kisol-Folie (Polyethylen-Folie) abgedeckt und der verbleibende Alkohol mit Filterpapier entfernt. Abschließend wurden die Präparate in eine Presse gelegt und für zwei Tage im Wärmeschrank bei 60 °C gepresst. Das garantierte die sichere Haftung der Schnittpräparate am Objektträger.

Die Kennzeichnung der Präparate mit Tiernummern erfolgte mit Bleistift auf den Objektträgern.

II.5.2 Färben der histologischen Präparate

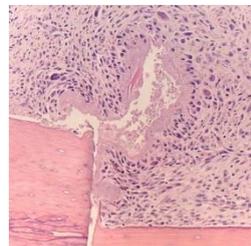
Färben der Paraffinschnitte

An den Paraffinschnitten der frühen Zeitpunkte (fünf und zehn Tage) wurden folgende histochemische Färbungen angewandt: Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Zudem wurde diese Färbung verwendet um den frühen, reaktiven Kallus zu quantifizieren. Zur Darstellung des Knorpels wurde die Alcianblau-/Kernechtrot-Färbung angewandt, anhand derer der chondrale Anteil am Gesamtkallus bemessen werden konnte. Die Movat-Pentachrom-Färbung diente der Visualisierung von trabekulärem Kallusgewebe. Anhand der Färbung kann eine Unterscheidung von Hart- und Weichteilkomponenten vorgenommen werden. Sie eignet sich aufgrund ihres Farbreichtums neben der Unterscheidung von Knochen und nicht-ossärem Gewebe vor allem zu Untersuchungen der chondralen Ossifikation und Knochenheilung (Abb. 10). Als Vorbereitung auf die Färbung wurden die in Paraffin konservierten Gewebsschnitte zunächst entparaffiniert, rehydriert und gespült. Dann konnte die gewünschte Färbung anhand des Färbeprotokolls angewendet werden (Tab. 4). Abschließend wurden die gefärbten Schnitte entwässert, entfettet und mit Eukitt eingedeckt. Zur besseren Haftung wurden die Schnitte über Nacht in waagerechter Position bei 37 °C gelagert.

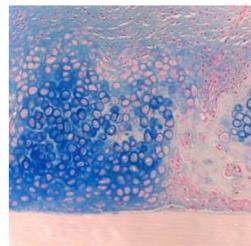
Tab. 4: Färbeprotokolle (frühe Zeitpunkte, Paraffin-Schnittpräparate)

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	Zeit [min]	Alcianblau-/Kernechtrot-Färbung	Zeit [min]	Movat-Pentachrom-Färbung	Zeit [min]
1. Hämatoxylin	7	1. 3%ige Essigsäure	3	1. Alcianblau	10
2. Aqua dest.	3x	2. 1% ige Alcianblau-Lösung	30'	2. Leitungswasser	5
3. HCl-Lösung	Kurz	3. 3%ige Essigsäure	Kurz	3. alkalischer Ethylalkohol	60

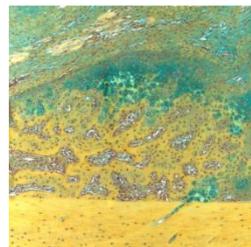
4. Leitungswasser	10	(spülen)	4. Leitungswasser	10
5. Eosin	3x	4. Aqua dest.	5. Aqua dest.	kurz
	kurz	5. Kernechtrot	6. Weigerts	10
6. 96%iges Ethanol	2x 2	6. Aqua dest	Eisenhämatoxylin	
7. 100%iges Ethanol	2x 2	7. Aufsteigende	7. Leitungswasser	15
		Alkoholreihe	8. Aqua dest	kurz
		(70, 80, 96, 100 %)	9. Brilliant Crocein-	10
			Säurefuchsin	
			10. 0,5%ige Essigsäure	kurz
			11. 5%ige	20
			Phosphorwolframsäure	
			12. 0,5%ige Essigsäure	2
			13. 100%iger Ethylalkohol	3x5
			14. Safron du Gâtinais	60
			15. 100% Ethylalkohol	kurz
			16. 100% Ethylalkohol	2
8. Entfetten mit Xylol	10	8. Entfetten mit Xylol	17. Entfetten mit Xylol	10
9. Eindecken		9. Eindecken	18. Eindecken	



(a) HE-Übersichtsfärbung, Beurteilung der Kallusgröße, der entzündlichen Reaktion und der Zellzusammensetzung (Kontroll-Gruppe, 10d)



(b) Alcianblau-/ Kernechtrotfärbung, Beobachtung der Knorpelausdehnung anhand des blau angefarbten Knorpels (Kontroll-Gruppe, 10d)



(c) Movat Pentachrom-Färbung, Beurteilung der trabekulären Kallusbildung. Knöchernen Strukturen stellen sich gelb dar, Knorpel ist grün angefärbt. (Kontroll-Gruppe, 10d)

Abb. 10: Übersicht der angewandten Färbungen an Tag 5 und 10

Färben der PMMA-Schnitte

Um die Gewebsschnitte für die histologischen Farbstoffe zugänglich zu machen, musste zunächst der Kunststoff komplett aus dem Gewebe gelöst werden. Dazu wurden die Schnitte in einem Methylmetacrylat (MEA)-Tauchbad entplastet. In Vorbereitung auf die Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült. Dann konnten die histologischen Färbungen von Kossa und Methylgrün / van Gieson nach dem in Tabelle 5 dargestellten Färbeprotokoll vorgenommen werden.

Die Versilberung nach von Kossa erlaubt die Unterscheidung von nichtmineralisiertem und mineralisiertem Gewebe. Dabei wird mineralisierter Knochen tiefschwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und Knorpel- sowie Bindegewebe bräunlich gefärbt (Abb. 11). Durch die Methylgrün / van Gieson-Färbung stellt sich Knochen rot, Knorpelgewebe blaugrün und Bindegewebe hellrot dar (Abb. 12).

Sowohl die Färbung nach von Kossa als auch die Methylgrün / van Gieson-Färbung zeichnen sich durch eine sehr kontrastreiche Darstellung aus. Die gefärbten Schnitte eigneten sich somit zur bildanalytischen Auswertung, die den Vorteil einer präzisen Erfassung und reproduzierbarer Datensätze bietet.

Tab. 5: Färbeprotokolle (späte Zeitpunkte, PMMA-Schnittpräparate)

Versilberung nach von Kossa	Zeit [min]	Methylgrün / van Gieson	Zeit [min]
Schnitte entplasten mit MEA	3x 20	Schnitte entplasten mit MEA	3x 20
Absteigende Alkoholreihe (100, 96, 80, 70%)	je 2	Absteigende Alkoholreihe (100, 96, 80, 70%)	je 2
Aqua dest.	2	Aqua dest.	kurz
3%ige Silbernitratlösung	5	Methylgrün	40
Aqua dest.	3x kurz	Aqua dest	kurz
Natrium-Formaldehyd-Lösung	2	70 % EtOH	2
Leitungswasser	10	Van Gieson	2
5%ige Natriumthiosulfat-Lösung	5		
Leitungswasser	10		
Aqua dest.	kurz		
Aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100%)	je 2	Aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 96, 100%)	je 2
Xylol	2x 5	Xylol	2x 5
Eindecken mit Vitroclud		Eindecken mit Vitroclud	

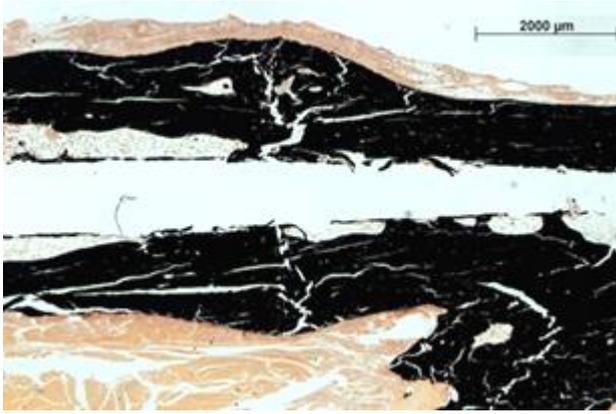


Abb. 11: Färbung nach von Kossa

Beispielhaftes Schnittpräparat (BMP-Gruppe, 84 d)
Beurteilung von Knochen (schwarz) und Weichteilgewebe (hellrot)

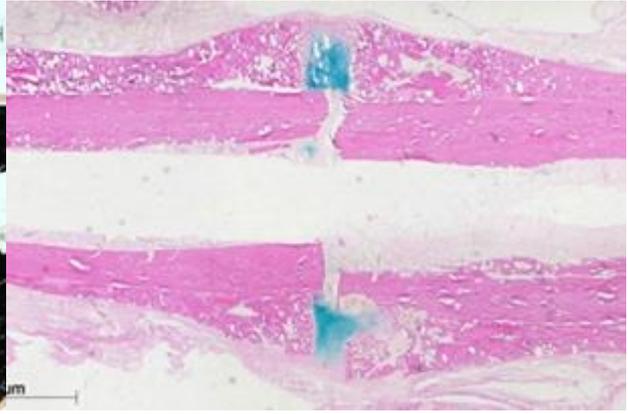


Abb. 12: Methylgrün/ van Gieson Färbung

Beispielhaftes Schnittpräparat (BMP-Gruppe, 42 d)
Beurteilung von Knochen (rot) und Knorpel (grün)

II.5.3 Immunhistochemische Färbung

An den frühen Gewebsschnitten wurde zudem eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Alpha-Smooth Muscle Actin (α SMA) durchgeführt. Bei α SMA handelt es sich um einen Antikörper gegen glatte Muskelzellen. Mit dieser Färbung stellen sich durch das Anfärben der glatten Muskelzellen in der Tunica media die Gefäße rötlich dar. Somit kann die Angiogenese im Kallus beurteilt werden (Abb. 13).

Vorbereitend auf die Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert, rehydriert und mit Phosphatpuffer zweifach für fünf Minuten gespült. Das Anfärben der Präparate erfolgte durch die ABC-alkalische Phosphatase-Technik unter Verwendung eines ABC-Elite-Kits von Vector. In diesem Kit ist equines Normalserum, ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper, sowie ein AB-Komplex (hochgereinigtes Avidin und biotinylierte Alkalische Phosphatase) in Tropfflaschen enthalten. Zunächst wurde das Gewebe 20 Minuten mit Normalserum bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer geblockt. Nach dem Abklopfen des Normalserums wurde der Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-AK gegen α SMA (Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark, Verdünnung 1:100), auf die Gewebsschnitte pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaliger Spülung in Pufferlösung wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper („rat absorbed“, Verdünnung 1:50) beschichtet. Der biotinylierte Zweitantikörper konnte nach anschließender Inkubation mit dem AB-Komplex (50 min, Raumtemperatur) gebunden werden. Es erfolgte ein erneutes Spülen der Schnitte in Puffer und eine Behandlung mit Chromogenpuffer (2x 5 min).

Jeder Schnitt wurde anschließend mit Chromogen beschichtet und unter Sichtkontrolle etwa zehn Minuten entwickelt. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült und mit Mayers Haemalaun-Lösung gegengefärbt. Nachdem die Schnitte mit Leitungswasser gespült waren und eine aufsteigende Alkoholreihe durchlaufen hatten, erfolgte das Eindecken mit Vitroclud.

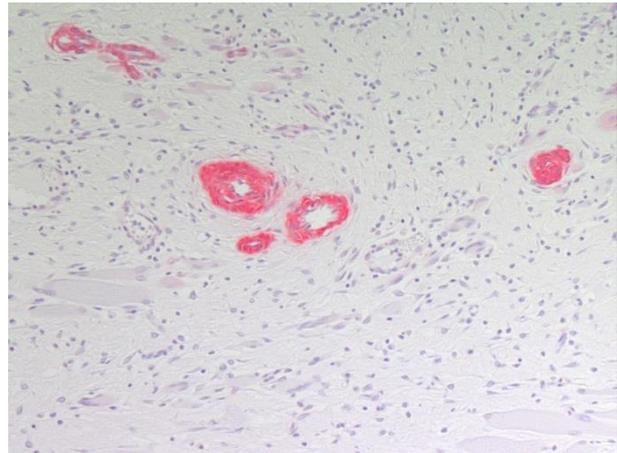


Abb. 13: α SMA-Färbung

Gefäße werden rot dargestellt

II.5.4 Lichtmikroskopische Beurteilung

Nach erfolgter Färbung aller Schnittpräparate wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop bei verschiedenen Vergrößerungen beurteilt.

II.6 Histomorphometrie

Bildanalytische Auswertung der frühen Zeitpunkte

Um die Gewebsschnitte mit einem Computerprogramm analysieren zu können, mussten diese zunächst digitalisiert werden. Dazu wurde eine an ein Mikroskop angeschlossene Digitalkamera und das Softwareprogramm Axio Vision 4.0 benutzt. Mit Hilfe dieses Programms konnte auch ein Maßstabsbalken in das Bild eingefügt werden. Die Bilder wurden dann mit dem Programm Adobe Photoshop CS4 geöffnet und anhand der entsprechenden Färbung das relevante Areal bemessen. Dann wurde die „Region of Interest“ (ROI) bestimmt. Dazu wurde der Tibiadurchmesser (Baseline), der Abstand zwischen der Außenseite der ventralen zu der Außenseite der dorsalen Kortikalis, ausgemessen. Die 1,5fache Verlängerung der Baseline definierte die Ausdehnung der ROI nach proximal und distal. In der Breite schloss die ROI den gesamten Kallusdurchmesser ein (Abb. 14). Die ausgemessenen Flächen wurden zudem unterteilt in anterior (ventral), posterior (dorsal) und proximal bzw. distal der Osteotomie.

Bei der HE-Färbung wurde die Fläche des reaktiven Kallus, der sich um die Osteotomie herum gebildet hatte, berechnet. Dazu wurde das Kallus-Areal manuell umfahren und

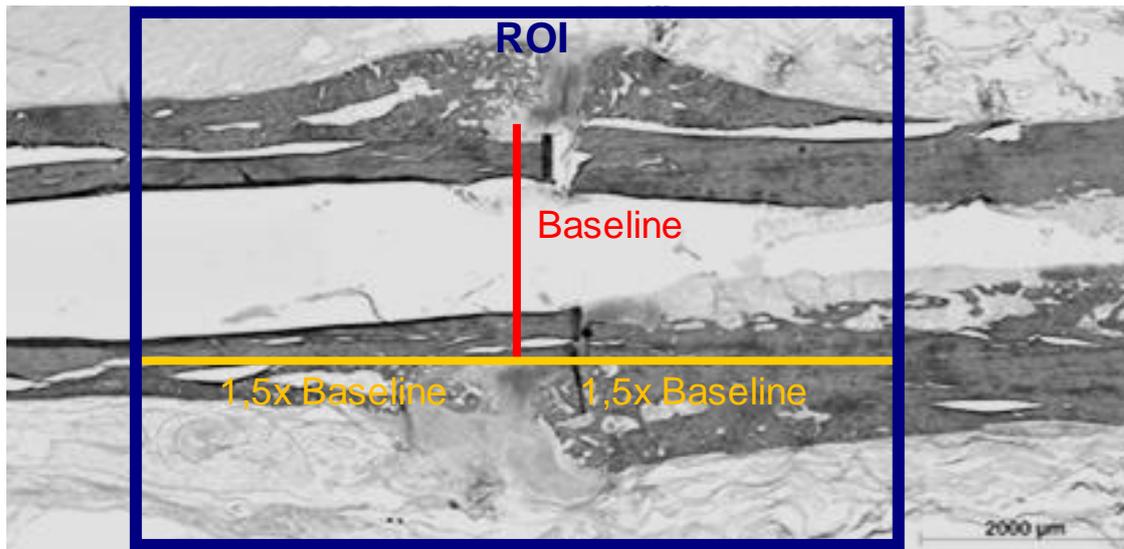


Abb. 14: Region of Interest (ROI)

Beispielhafte Darstellung zur Ermittlung der ROI am histologischen Schnittpräparat einer Rattentibia.

anschließend die Fläche nach der Kalibrierung anhand des Maßstabsbalkens berechnet.

Die mit Alcianblau-/Kernechtrot gefärbten Präparate wurden zur Quantifizierung der neugebildeten Knorpelmasse genutzt. Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurden die blau gefärbten Knorpelanteile im Kallus, welche innerhalb der ROI lagen, vermessen. Zur Beurteilung der Angiogenese im Kallus der Osteotomie wurden die digitalisierten Schnitte, welche mit der immunhistochemischen Färbung α SMA angefärbt waren, ausgewertet. Bei 10facher Vergrößerung wurden die im Kallus vorhandenen Gefäße innerhalb der ROI mit einem Zählgerät gezählt.

Bildanalytische Auswertung der späten Zeitpunkte

Zunächst wurden die gefärbten Schnitte ebenfalls digitalisiert und mit einem Maßstabsbalken ausgestattet. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm KS 400. Dabei wurden die Messungen für die Färbungen von Kossa / Safranin O. und Methylgrün / van Gieson getrennt durchgeführt. Jede Messung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Flächen im distalen, danach im proximalen Anteil des Osteotomiekallus errechnet und durch Addition das Ergebnis für das Gesamtpräparat ermittelt. Dabei wurde bei jeder Messung mit KS 400 zunächst die Kalibrierung vorgenommen, indem ein Rahmen exakt an den Maßstabsbalken angelegt wurde. Zum Abschluss der Kalibrierung wurde die Einheit [mm] der zu berechnenden Bereiche festgelegt. Dann wurden nacheinander die Flächen des periostalen und des

endostalen Kallus sowie der Kortikalis manuell farbig markiert. Nach Markierung sämtlicher Bereiche wurde die „Region of Interest“ (ROI) wie im obigen Absatz beschrieben festgelegt.

Innerhalb der ROI wurden in den von Kossa gefärbten Präparaten die knöchernen Bereiche und in den Lichtgrün/Safranin O. gefärbten Schnitten die knorpeligen Areale im Kallus der Osteotomie errechnet.

Da die manuelle Markierung gegebenenfalls nicht gewünschte Areale enthielt, wurde vor Beendigung des Messvorgangs mit KS 400 eine Segmentierung durchgeführt. Durch die Segmentierung wurde eine Binärmaske vorgegeben, die zwei Farbinformationen differenzierte. Wenn auch im Rahmen der Segmentierung nicht geforderte Flächen mit einbezogen waren, erfolgte abschließend eine manuelle Korrektur zur Sicherstellung der exakten Flächenberechnung.

Dann wurden folgende Parameter mit dem Programm KS 400 bestimmt:

Ti.Dm (Tibiadurchmesser oder Baseline)		[mm]
Ct. (Kortikalis)	Ct.Ar (Gesamtfläche Kortikalis)	[mm ²]
	Md.Ar/Ct.Ar (Knöcherner Anteil Kortikalis)	[%]
Cl. (Gesamtkallus)	Cl.Ar (Gesamtfläche Kallus)	[mm ²]
	Md.Ar.Cl (Knöcherne Fläche Gesamtkallus)	[mm ²]
	Md.Ar/Cl.Ar (Knöcherner Anteil Gesamtkallus)	[%]
	Cg.Ar.Cl (Knorpelfläche Gesamtkallus)	[mm ²]
	Cg.Ar/Cl.Ar (Knorpelanteil Gesamtkallus)	[%]
Ps. (Periostaler Kallus)	Ps.Cl.Ar (Gesamtfläche periostaler Kallus)	[mm ²]
	Ps.Cl.Ar/Ti.Dm (Fläche periostaler Kallus/ Baseline)	[mm]
	Md.Ar.Ps.Cl (Knöcherne Fläche periostaler Kallus)	[mm ²]
	Md.Ar/Ps.Cl.Ar (Knöcherner Anteil periostaler Kallus)	[%]
	Cg.Ar.Ps.Cl (Knorpelfläche periostaler Kallus)	[mm ²]
	Cg.Ar/Ps.Cl.Ar (Knorpelanteil periostaler Kallus)	[%]
Es. (Endostaler Kallus)	Es.Cl.Ar (Gesamtfläche endostaler Kallus)	[mm ²]
	Md.Ar.Es.Cl (Knöcherne Fläche endostaler Kallus)	[mm ²]
	Md.Ar/Es.Cl.Ar (Knöcherner Anteil endostaler Kallus)	[%]
	Cg.Ar.Es.Cl (Knorpelfläche endostaler Kallus)	[mm ²]
	Cg.Ar/Es.Cl.Ar (Knorpelanteil endostaler Kallus)	[%]

Die Bezeichnung der Parameter folgte der Empfehlung von Parfitt zur Vereinheitlichung der Nomenklatur von histomorphometrischen Untersuchungen (Tab. 6).

Tab. 6: Abkürzungsverzeichnis nach Parfitt

Är	Area (Fläche)
Cg	Cartilage (Knorpel)
Cl*	Callus (Kallus)
Ct	Cortex (Kortex)
Es	Endostal
Md	Mineralized (mineralisiert)
Ps	Periostal
Ti.Dm.	Tibial Diameter (Tibiadurchmesser)

*nicht Teil der Klassifikation nach Parfitt

II.7 Statistik

Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit der Software Excel. Es wurden die Median-Werte mit den dazugehörigen Perzentilen errechnet.

Die Erstellung von Boxplots und die statistische Auswertung wurde mit der Software SPSS durchgeführt. Es wurde ein Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben bei einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angewandt.

II.8 Verwendete Materialien und Geräte im Überblick

Titan-Kirschner-Drähte als Implantate und Beschichtung

Implantate: Titan-Kirschner-Drähte (Ti-6Al-4V)(Ø 1,0 mm) (Synthes, Bochum, Dtl.)

Beschichtung: Poly[D,L-Laktid] (Resomer 203, Boehringer, Ingelheim, Dtl.)

Wirksubstanz: rekombinant humanes BMP-2 (Fa. Osteogenetics, Prof. Sebald, Würzburg, Dtl.)

Anästhesie, Analgesie und Tötung

Gerät: Narkosegerät ARTEC (Stephan, Gackenberg, Dtl.)

Medikamente: Forene (1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether) (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Dtl.), Ursotamin (Ketaminhydrochlorid) (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Dtl.), Rompun 2% (Xylacinhydrochlorid) (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Dtl.), Gentamycin Augensalbe 0,3% (mephano Arzneimittel GmbH, Rüdersdorf, Dtl.), Temgesic (Buprenorphin) (Essex Pharma GmbH, München, Dtl.), Kaliumchlorid 14,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.)

Der operative Eingriff

Operationsbesteck: Kirschnerdrähte aus Stahl (Ø 0,8 und Ø 1,0 mm; Synthes, Bochum, Dtl.), Präparierschere, Pinzette anatomisch und chirurgisch, Nadelhalter, Kneifzange, Einmalskalpell No. 15 (Feather Safety Razor Co. Ltd., Medical Division, Osaka, Japan)

Geräte: Diamant-Drehscheibe (Horico-Hopf, Ringleb & Co. GmbH & Cie, Berlin, Dtl.), Röntgenbogen Siremobil Iso-C (Siemens AG, München, Dtl.), Elektorasierer Favorita II GT 104 (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Dtl.), Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106 (Sartorius, Göttingen, Dtl.)

Sonstiges: Nahtmaterial Vicryl 5-0 (Polyglactin 910, Ethicon GmbH, Norderstedt, Dtl.), Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Jena, Dtl.), Enthaarungscreme Pilca (Schwarzkopf/Henkel, Düsseldorf, Dtl.), isotone Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg, Dtl.)

Radiologische Kontrolle

Geräte und Materialien: Röntgengerät Mobilett Plus (Siemens AG, München, Dtl.), Röntgenplatten: Fuji IP Cassette 3A, 24 x 30 cm (Fuji Photo Film Co., LTD, Japan)

Biomechanische Testung

Materialien: Technovit 3040 (Flüssigkeit und Pulver) (Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim, Dtl.), isotone Natriumchloridlösung Plastipur (Fresenius, Bad Homburg, Dtl.)

Geräte: Torsionstestmaschine Zwick (Zwick, Ulm, Dtl.), Messkraftverstärker Typ MCG (HBM, Darmstadt, Dtl.)

Software: Catman 32 (HBM, Darmstadt, Dtl.), Excel (Microsoft, USA)

Histologische Untersuchung

Verbrauchsmaterialien: Plastikkassetten Tissue Tek (Sakura, Torrance, USA), Objektträger HistoBond 75 x 25 x 1 mm (Paul Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Dtl.), Kisol-Folie 0,025 x 95 x 95 mm (Medim Histotechnologie GmbH, Gießen, Dtl.)

Geräte: Schüttler HS 501 digital (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Dtl.), Handschleifgerät Phoenix 3000 (Jean Wirtz Laborgeräte Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Dtl.), Mikrotom SM 2500S (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Bensheim, Dtl.), Rotationsmikrotom RM 2125 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Bensheim, Dtl.), Wärmeschrank Function Line Typ B12 (Heraeus Instruments Kendro Laboratory Products, Hanau, Dtl.)

Chemikalien und Färbelösungen: Fixierlösung (Zusammensetzung: 324 ml Formaldehyd (37%), 550 ml Alkohol (100%), 130 ml Barbitol-Na-Puffer (0,1 molar, pH 7,3), 6 g Glukose), Alkohol (70, 80, 96, 100%) (Merck, Darmstadt, Dtl.), Xylol (Merck, Darmstadt, Dtl.), Technovit 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Dtl.), Schneideflüssigkeit (WIV, Schwetzingen, Dtl.), Streckflüssigkeit (30 ml 2-Butoxyethylen-Acetat, 70 ml Alkohol 70%) (Merck, Darmstadt, Dtl.), Eukitt (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.), Vitroclud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Dtl.), Alcianblau 8GS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.), Kernechtrot-Aminiumsulfat (Division Chroma, Münster, Dtl.), 2-Methoxyethyl-Acetat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Dtl.), Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Dtl.), 3%ige Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), 5% Natriumthiosulfatlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), 1%ige wässrige Methylgrünlösung (Merck, Darmstadt, Dtl.), Pikrofuchsinlösung van Gieson (Division Chroma, Münster, Dtl.)

Immunhistochemie: Vectastain Elite ABC Kit (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Dtl.), α SMA-AK (Verdünnung 1:100) (Dako, Glostrup, Dänemark), Chromogen (Alkaline Phosphatase Kit 1, SK-5100, Vektor Laboratories, Burlingame, USA), Mayer Haemalaun-Lösung (Verdünnung 1:2) (Merck, Darmstadt, Dtl.)

Sonstiges: Bildanalyseprogramm KS 400 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dtl.), Mikroskop DM R (Leica Mikroskope & Systeme GmbH, Wetzlar, Dtl.), Kamera AxioCam MRc5 und Softwareprogramm Axio Vision 4.0 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dtl.), Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA), Excel (Excel Version 2003, Microsoft, USA), Statistic-Software SPSS (SPSS Version 14.0, USA).

III ERGEBNISSE

Diese Studie befasste sich mit der Untersuchung der Wirkung des Wachstumsfaktors BMP-2 auf eine Osteotomie der Rattentibia. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind Bestandteil des Promotionsthemas von Camilla Bergmann und wurden freundlicherweise als Vergleich zur BMP-Gruppe der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Der Fokus der nachfolgenden Beschreibungen liegt auf den Ergebnissen der BMP-Gruppe.

III.1 Ausfälle, Operationstoleranz und postoperativer Verlauf

Zwei Tiere verstarben nach Injektion des Narkotikums an unbekannter Ursache. Bei einem Tier der 5-Tage-Gruppe wurde der Knochen beim Verschieben des beschichteten Kirschner-Drahtes anterior gesplittet, sodass der Draht distal der Osteotomie aus der Tibia hervorstach. Dieses Tier wurde aus der Studie genommen.

Alle in die Studie eingeschlossenen Versuchstiere tolerierten die Operation gut und rehabilitierten schnell von dem Eingriff. Einige Tiere nagten in den ersten postoperativen Tagen an der OP-Naht, was teilweise zu kleinen Hautverletzungen führte. Die Naht blieb dabei unversehrt, sodass es nicht zur Wiedereröffnung des Operationssitus kam. Bei keinem Versuchstier wurden Wundkomplikationen oder makroskopische Zeichen von Infektionen festgestellt. Der postoperative Verlauf war komplikationsfrei und alle Versuchstiere konnten die operierte Extremität schnell voll belasten.

III.2 Postoperative klinische und radiologische Untersuchungen

Körpergewicht

Bei allen Tieren wurde direkt vor dem operativen Eingriff eine Gewichtsbestimmung durchgeführt, um die entsprechende Dosierung des Narkosegemischs zu ermitteln. Im postoperativen Verlauf wurden die Tiere an den Tagen 28, 42 und 84 gewogen, um das Wohlergehen der Tiere zu beurteilen.

Die Ergebnisse wurden als Median-Werte in graphischer Form dargestellt (Abb. 15). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der BMP-Gruppe waren keine

Gewichtsverluste zu beobachten. In beiden Gruppen zeichnete sich eine konstante Gewichtszunahme ab.

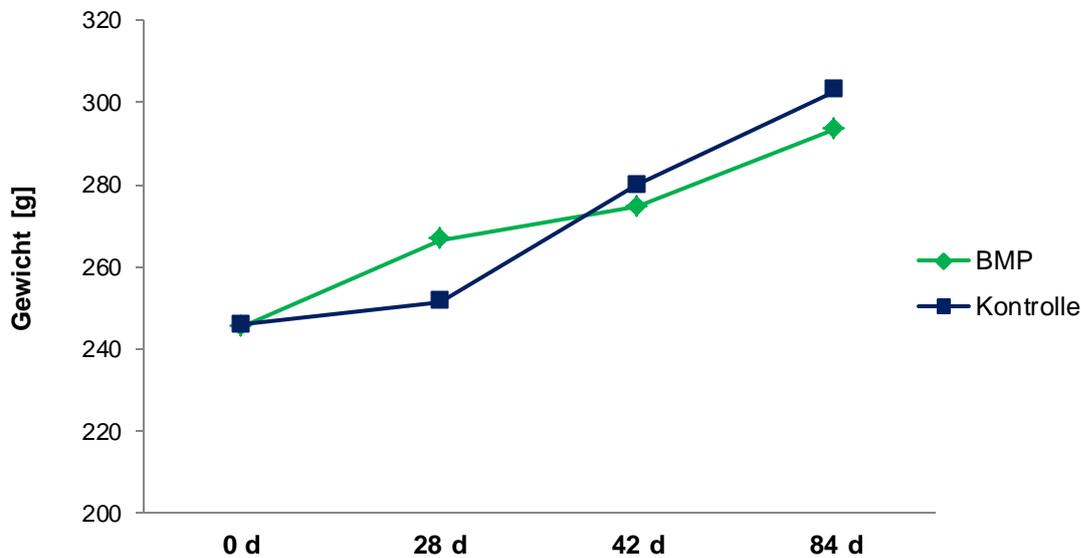


Abb. 15: Graphische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere
Kontrollgruppe in blau, BMP-2-Gruppe in grün dargestellt

Makroskopische Beobachtung

Bereits bei der postmortalen Präparation und Entnahme der Tibiae machten die osteotomierten, mit BMP-2 behandelten Knochen einen wesentlich stabileren Eindruck als die osteotomierten Knochen der Kontrollgruppe. Die postmortale Entfernung des Kirschner-Drahts aus dem Tibia-Markraum gestaltete sich jedoch bei der BMP-2-Gruppe schwierig. Es war eine deutlich größere Kraftaufwendung nötig, um den Draht aus dem Knochen herauszudrehen als bei der Vergleichsgruppe.

Weiterhin war bei einigen Tieren der BMP-Gruppe eine knöcherne Wucherung (Exostose) an der Stelle des Drahteintritts an der proximalen Tibia zu beobachten (Abb. 18). Diese war auch röntgenologisch nachweisbar. Die zusätzliche Verknöcherung erschwerte den Zugriff auf den intramedullär liegenden Draht.

Radiologische Kontrollen

Mit konventionellen Röntgenaufnahmen wurde überprüft, ob es zu einer Konsolidierung der Osteotomie kam. Die radiologischen Kontrollen erfolgten direkt postoperativ sowie an den Tagen 28, 42 und 84 (Abb. 16). Die Aufnahmen wurden in der posterior-

anterioren und der lateralen Ebene angefertigt, um die Röntgenbilder mittels des Röntgenscores auszuwerten. Dabei wurde das Heilungsstadium der Versuchstiere in Kategorie A bis C eingeteilt (Tab. 3). Die Zuordnung in eine Kategorie erfolgte auf der Grundlage des Auszählens der überbrückten Kortizes (Abb. 17).

In den direkt postoperativ aufgenommenen Röntgenbildern war der Osteotomiespalt der

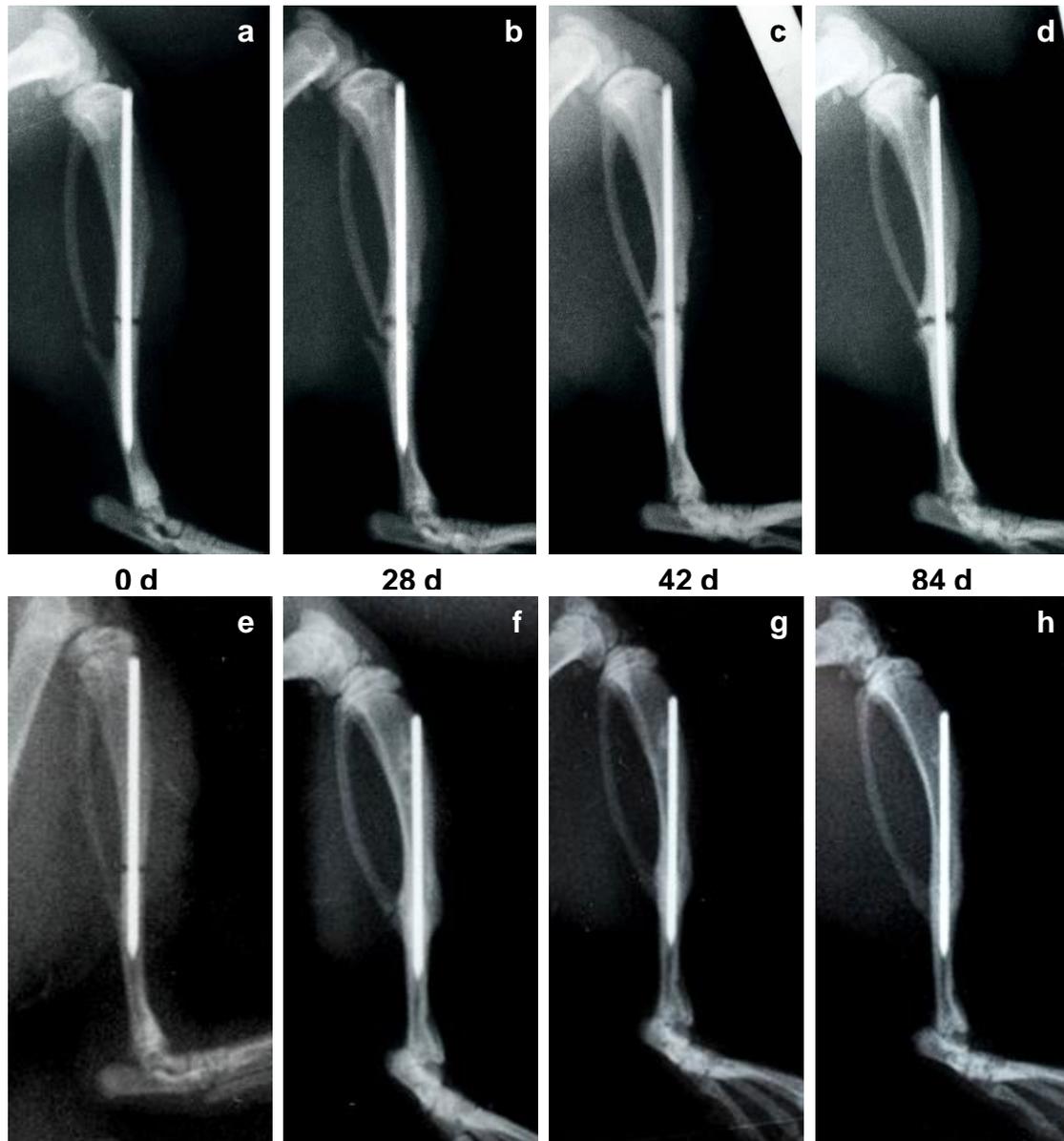


Abb. 16: Exemplarischer Röntgenaufnahmen in der lateralen Ebene im zeitlichen Verlauf

Kontrollgruppe (a-d):

Im gesamten Verlauf ist keine knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts zu erkennen. Nach 84 Tagen (d) ist eine Pseudarthrose entstanden. Es fällt eine progressive Zunahme der Knochendicke an den Osteotomierändern auf.

BMP-2-Gruppe (e-h):

Nach 28 Tagen (f) ist ein röntgendichter Kallus um den Osteotomiespalt herum entstanden. Der Knochenspalt ist bereits einseitig knöchern überbrückt. Nach 42 Tagen (g) hat sich der Kallus reduziert. Nach 84 Tagen (h) ist die Tibia komplett verheilt.

Tibia und die Fraktur der Fibula bei allen Versuchstieren deutlich sichtbar. Bei einem Tier der Gruppe mit fünf Tagen Standzeit war der Knochen distal der Osteotomie gesplittert. Bei den restlichen Tieren waren die Knochenenden intakt. Es lag soweit anhand der Röntgenaufnahmen beurteilbar keine Dislokation vor und der intramedulläre Draht befand sich in der korrekten Position.

Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, 28 Tage postoperativ, war bei keinem der Tiere eine komplette Heilung (Kategorie C) zu verzeichnen. In der BMP-Gruppe war bei 14 der insgesamt 36 Aufnahmen zu diesem Zeitpunkt eine unilaterale Überbrückung (Kategorie B) des Osteotomiespalts sichtbar. Bei der Kontrollgruppe hingegen war nur bei fünf Tieren ein Voranschreiten der Knochenheilung im Sinne einer einseitigen knöchernen Überbrückung der Osteotomie erkennbar.

Nach 42 Tagen hatte in beiden Gruppen noch kein Tier eine vollständige Konsolidierung erreicht. In der BMP-Gruppe zeigte sich bei 14 von 24 Versuchstieren eine Knochenheilung der Kategorie B in den Röntgenbildern. In der Kontrollgruppe wurde nur bei einem der 24 radiologischen Verlaufsaufnahmen eine unilaterale

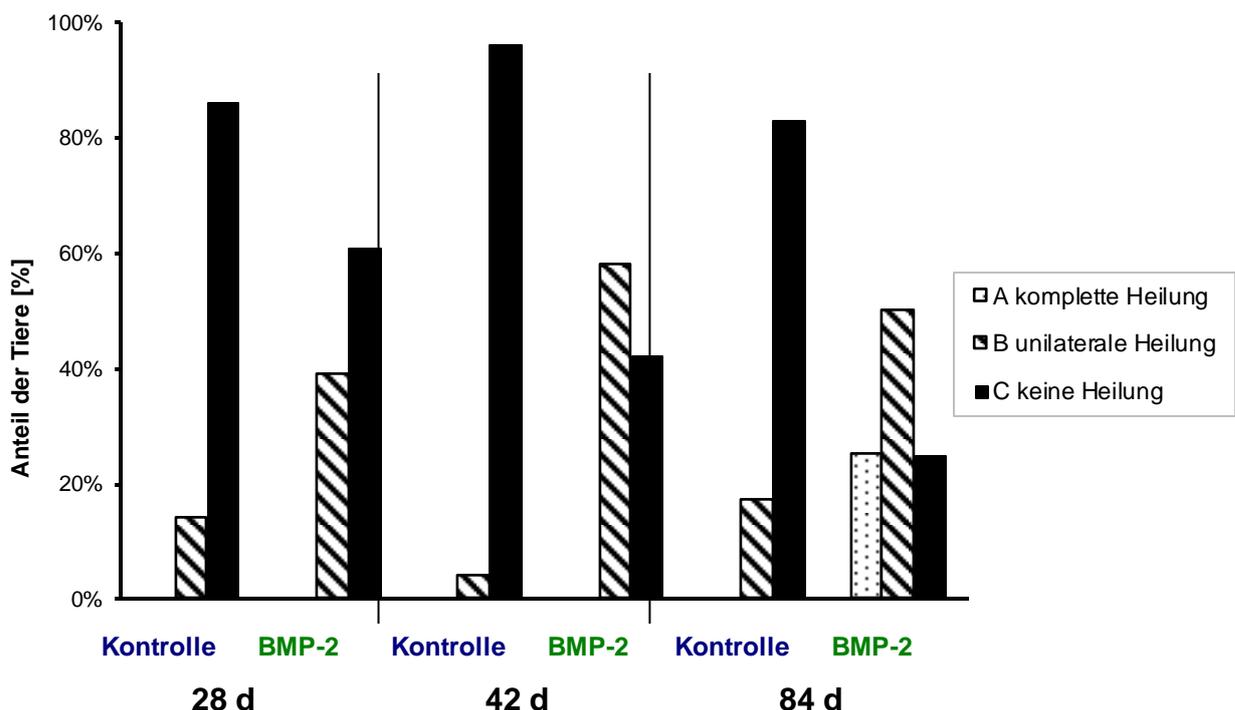


Abb. 17: Graphische Darstellung der Ergebnisse der radiologischen Kontrollen

Überbrückung des Osteotomiespalts gesehen.

In den abschließenden Röntgenaufnahmen nach 84 Tagen wurden pro Gruppe 12 Tiere beurteilt. In der BMP-Gruppe zeigte sich bei drei Tieren eine komplette Heilung

(Kategorie C). Das bedeutet, dass alle vier Kortizes knöchern überbrückt wurden. Bei sechs Tieren war eine unilaterale Überbrückung des Osteotomiespalts vorhanden, während auf den restlichen drei Röntgenbildern keine Konsolidierung zu sehen war (Kategorie A). In der Vergleichsgruppe war bei den meisten Tieren keine knöcherne Überbrückung der Kortizes zu erkennen. Es zeigten nur zwei Tiere eine Heilung der Kategorie B.

Insgesamt war in der BMP-Gruppe ein deutlich besserer Heilungsverlauf zu beobachten als in der Kontrollgruppe, wo es auch nach 84 Tagen nicht zu einer vollständigen Konsolidierung der osteotomierten Tibia kam.

Neben dem Heilungsverlauf wurde bei der Bewertung der Röntgenbilder ebenfalls auf Veränderungen des Knochens oder sonstige Besonderheiten geachtet. Ein besonderer Fokus lag auf dem Erkennen von Infektionsanzeichen und Osteolysen. Bei zwei Tieren der BMP-Gruppe mit einer Standzeit von 84 Tagen zeigte sich in den Röntgenaufnahmen eine Osteolyse. In der BMP-Untergruppe mit der 42-tägigen Standzeit fiel bei zwei Tieren eine zystenförmige, osteolytische Auftreibung an der Draht Eintrittsstelle auf. Bei einem Tier der BMP-2-Gruppe (84 Tage Standzeit) konnte im Verlauf ein minimales Absinken des intramedullären Drahts nach distal beobachtet werden.

Des Weiteren zeigten sich bei einigen Tieren der BMP-Gruppe neugebildete Exostosen auf den Röntgenaufnahmen (Abb. 18). Als Exostosen bezeichnet man eine abgegrenzte Neubildung von kompakter Knochensubstanz. Diese entstehen in der Regel als hyperplastische Reaktion auf mechanische Reize oder eine Infektion des Periosts. Die Exostosen stellten sich in den radiologischen Aufnahmen röntgendicht dar und waren an der Stelle des Draht eintritts lokalisiert.

Bei der Betrachtung der Röntgenbilder fiel auf, dass die Ausprägung der Exostosen mit dem zeitlichen Verlauf variierte. Nach 28 Tagen wurde bei drei Tieren ein knöcherner Zuwachs beobachtet. Nach 42 Tagen war bei drei weiteren Tieren das Auftreten von Exostosen zu beobachten. Nach 84 Tagen waren zwar ebenfalls noch bei drei Tieren knöcherne Zuwächse an der proximalen Tibia erkennbar, jedoch in wesentlich geringerer Ausprägung.

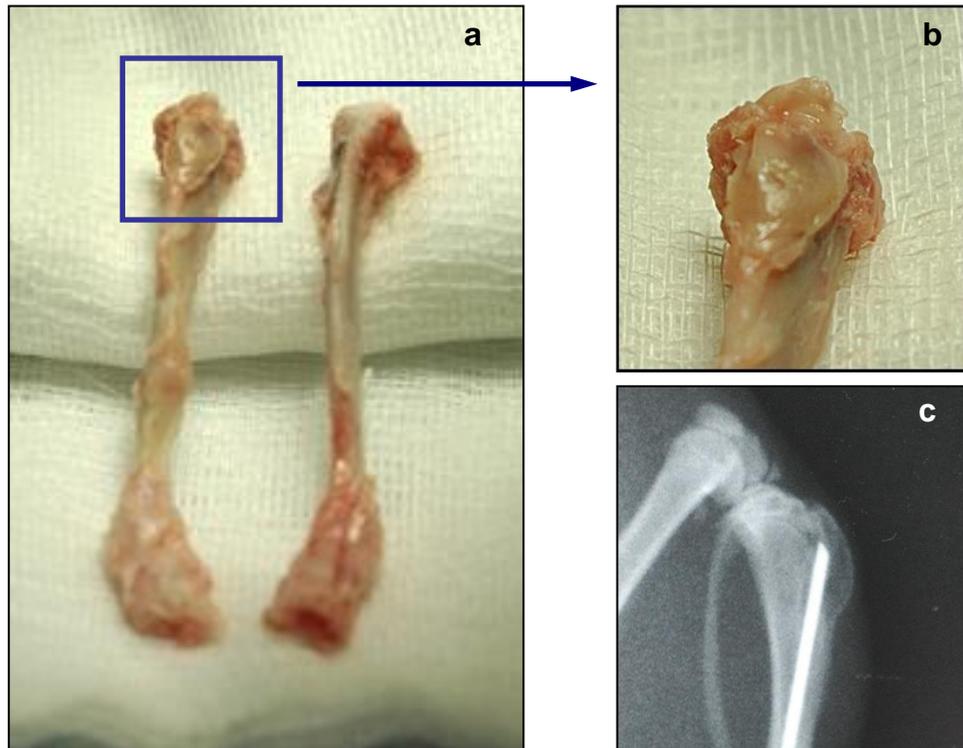


Abb. 18: Exostosen in der makroskopischen Ansicht und im radiologischen Korrelat

Pathologisch veränderte Tibia neben dem gesunden kontralateralen Knochen (a). Die Exostose auf der Tuberositas Tibia ist blau umrandet und vergrößert dargestellt (b). Auf dem Röntgenbild der lateralen Ebene ist die Exostose als zystisch aufgetriebene, röntgendichte und klar abgegrenzte Wucherung zu sehen (c).

Ergebnisse der bakteriellen Untersuchung

Es wurden bei jeweils drei Tieren mit den Standzeiten 28, 42 und 84 Tagen postmortal Abstriche für eine bakterielle Untersuchung entnommen. Insgesamt war bei zwei von neun untersuchten Tieren ein bakterielles Wachstum anhand der Abstriche nachweisbar. Bei dem einen handelte es sich um einen Abstrich des Osteotomie-Kallus eines Tieres der 28 Tage-Gruppe, bei dem nach 48 Stunden Inkubation ein Keimwachstum des *Staphylococcus aureus* zu beobachten war. Der zweite positive Abstrich wurde bei einem Tier der Gruppe 42 Tage intramedullär entnommen. Dabei wuchsen nach 48 Stunden Kolonien des *Staphylococcus epidermidis*.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war ein wesentlich geringes Keimwachstum zu verzeichnen (Tab. 7).

Tab. 7: Ergebnisse der bakteriellen Untersuchung

Lokalisation des Abstrichs	Art des Keims	PDLLA Test positiv	Unter- suchungs- tag [post OP]	BMP-2 Test positiv	Art des Keims	Lokalisation des Abstrichs
Kallus	E. coli	1/3	28 d	1/3	Staphylococcus	Kallus
1 Kallus 1 intramedullär	Staphylococcus	2/9	42 d	1/3	Staphylococcus	intramedullär
1 Kallus 1 intramedullär	Staphylococcus	2/6	84 d	0/3	-	-

III.3 Biomechanische Testung

Im Rahmen der biomechanischen Untersuchung wurden sowohl die osteotomierte als auch die kontralaterale, intakte Tibia der Versuchstiere torsional getestet. Die Auswertung der biomechanischen Untersuchung erfolgte anhand der Parameter maximales Drehmoment und torsionale Steifigkeit. Die ermittelten Daten werden tabellarisch mit Median-Werten und graphisch in Form von Boxplots dargestellt. Die Ergebnisse für die osteotomierten Tibiae werden als prozentualer Anteil des von der gesunden Tibia ermittelten Wertes angegeben.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit PDLLA erzielte die BMP-2-Gruppe wesentlich höhere Werte in der torsionalen Testung. Dieser Unterschied war zu den Zeitpunkten 28 Tage und 42 Tage postoperativ signifikant (Abb. 19).

Dabei betrug der Median für das maximale Drehmoment nach 28 Tagen in der BMP-Gruppe 40,4 % und in der Kontrollgruppe 13,1 %. Demnach brach der osteotomierte Knochen in beiden Gruppen bereits bei deutlich geringerer Belastung als die gesunde Gegenseite. Nach 42 Tagen betrug der mediane Wert 126,5 % in der BMP-Gruppe und 25,2 % in der Vergleichsgruppe. Nach 84 waren die behandelten Knochen mit einem Median-Wert von 52,3 % (Kontrollgruppe 44,3 %) in der Torsion weniger belastbar als die gesunde kontralaterale Tibia.

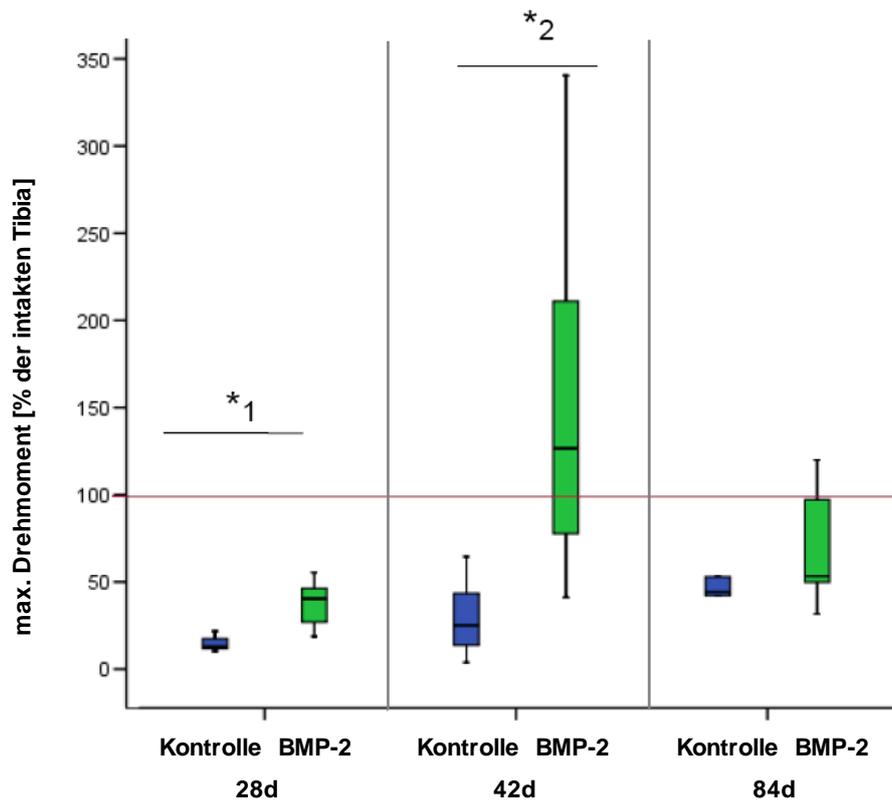


Abb. 19: Maximales Drehmoment [%] zur gesunden Seite
 p-Werte: *1 = 0.039, *2 = 0.01

Die torsionale Steifigkeit wurde ebenfalls in Referenz zur gesunden Tibia gemessen. Die Testung ergab, dass die BMP-2 Gruppe zu jedem Zeitpunkt höhere Ergebnisse in der Messung der torsionalen Steifigkeit erzielte als die Kontrollgruppe mit PDLLA. Diese Unterschiede waren für die Gruppen 28 und 42 Tage signifikant (Abb. 20).

Nach 28 Tagen betrug der mediane Wert für die torsionale Steifigkeit 34,3 % in der BMP-Gruppe und 7,5 % in der Kontrollgruppe. Nach 42 Tagen zeigte die mit BMP-2 behandelte Osteotomie-Tibia eine höhere Steifigkeit als die Referenz Tibia mit Median-Werten von 136,9 %. In der Vergleichsgruppe betrug der mediane Wert für die torsionale Steifigkeit nach 42 Tagen 15,6 %. In der BMP-Gruppe erreichten nach 84 Tagen die operierten Tibiae ähnliche Werte in der torsionalen Testung wie die intakte Gegenseite mit einem Median-Wert von 91,1 %. Bedeutend schlechter schnitt die Kontrollgruppe nach 84 Tagen mit 21,4 % torsionale Steifigkeit der intakten Tibia ab.

Anhand der teilweise großen Spannweite der Boxplots ist zu erkennen, dass die Werte für das maximale Drehmoment und die torsionale Steifigkeit auch innerhalb einer

Gruppe zum Teil stark differierten. Diese Werte korrelieren auch mit der Auswertung der Röntgenbilder, die ebenfalls divergierende Heilungsverhalten zeigten.

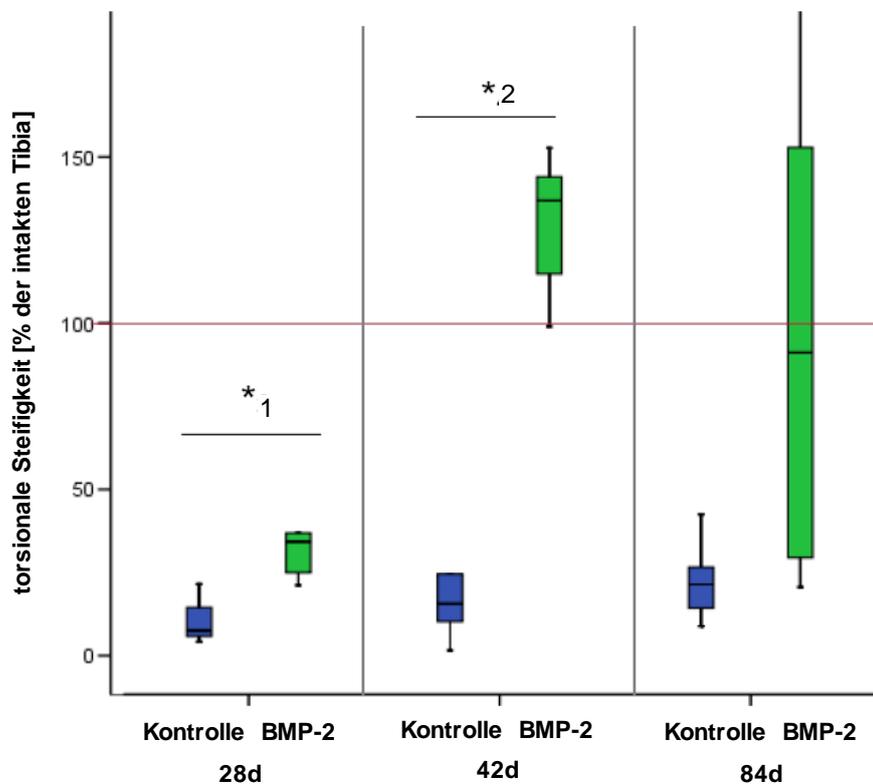


Abb. 20: Torsionale Steifigkeit [%] zur gesunden Seite

p-Werte: *1 = 0.039, *2 = 0.004

Weiterhin fiel auf, dass die unbehandelten Tibiae der beiden Gruppen sowohl in der Testung des maximalen Drehmoments als auch in der torsionalen Steifigkeit unterschiedliche Werte erzielten (Tab. 8). Im angewandten Mann-Whitney-Test zeigte sich für diese Ergebnisse jedoch keine Signifikanz ($p > 0,05$).

Tab. 8: Ergebnisse der Zwick-Testung der gesunden Tibia.

	28 d	42 d	84 d
	Median (25. – 75. Perzentile)		
max. Drehmoment [Nmm] Kontrolle	193 (182 - 200)	151 (126 - 166)	148 (148 – 179)
max. Drehmoment [Nmm] BMP 2	145 (145 – 145)	163 (102 – 224)	191 (175 – 217)
Torsionale Steifigkeit [Nmm/°] Kontrolle	8,4 (6,1 – 12,4)	9,7 (7,3 – 14,8)	13,4 (9,8 – 20,5)
Torsionale Steifigkeit [Nmm/°] BMP 2	9,3 (7,9 – 12,6)	12,9 (9,6 – 14,0)	10,5 (9,6 – 12,2)

III.4 Histomorphologische Beobachtung

Die Schnittpräparate wurden histomorphologisch bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Lichtmikroskop beurteilt und mit Hilfe der Bildanalyse quantitativ histomorphometrisch ausgewertet.

Deskriptive Analyse der frühen Zeitpunkte

An den Paraffin-Gewebsschnitten der frühen Zeitpunkte wurden folgende drei Färbungen angewandt: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Alcianblau-/Kernechtrot-Färbung und Movat-Pentachrom-Färbung. Bei der histologischen Analyse der Schnitte wurden das Kallusvorkommen und die Kalluszusammensetzung beurteilt. Insbesondere wurde ein Augenmerk auf eventuell vorliegende Entzündungen, die knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts und Knorpelvorkommen sowie die Knorpelverteilung gelegt.

Fünf Tage nach der Osteotomie war weder bei der Kontrollgruppe noch bei der BMP-Gruppe eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts erkennbar. Die Knochenränder der Osteotomie waren glatt, jedoch waren teilweise kleine Knochensplinter in der Umgebung zu finden. In beiden Gruppen hatte die Kallusbildung begonnen.

In den Schnitten der BMP-Gruppe zeigte sich eine Infiltration von Entzündungszellen um den Osteotomiespalt herum. Das Zellbild bestand vor allem aus Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und wenigen Monozyten. Im Osteotomiespalt hatte sich ein Hämatom gebildet, das teilweise von Zelltrümmern durchsetzt war. Die Knorpelbildung war fünf Tage postoperativ gering ausgeprägt. Vereinzelt konnten Chondroblasten mit etwas Knorpelmatrix lateral der Osteotomie gesehen werden. Außerdem hatte sich mit einigem Abstand proximal und distal des Osteotomiespalts eine manschettenartige Knorpelansammlung an die Kortizes angelagert. Diese war zum Teil bereits durch Geflechtknochen ersetzt.

In der Vergleichsgruppe war fünf Tage post operationem eine stärkere Entzündungsreaktion und ein hypertropher Kallus zu beobachten. Die Ausdehnung des Entzündungsbereichs und die Anzahl von Entzündungszellen waren wesentlich größer als bei der BMP-Gruppe. Während in der BMP-Gruppe nur wenig Zelldetritus im Osteotomiespalt vorlag, war in der Kontrollgruppe auch außerhalb des Spalts Zelldetritus zu finden. Eine Knorpelbildung war nur in geringer Ausprägung lateral des

Osteotomiespalts in Form von Knorpelinseln zu finden. Es konnte wie in der BMP-Gruppe ebenfalls eine Anlagerung von Geflechtknochen und Knorpel an den Kortizes beobachtet werden.

Zehn Tage nach der Osteotomie zeichnete sich in beiden Gruppen keine knöcherne Überbrückung der Osteotomie ab. Die Ränder des Knochenspalts waren weiterhin größtenteils glatt ohne größere Knochenabsplitterungen oder Resorptionslakunen. Im Osteotomiespalt der Kontrollgruppe war hauptsächlich Zelldetritus zu finden. Bei der BMP-Gruppe war der Spalt hingegen bereits teilweise mit Bindegewebszellen ausgefüllt. Die Kallusbildung war in beiden Gruppen vorangeschritten, jedoch fiel in der Kontrollgruppe eine überschießende Kallusbildung auf (Abb. 21). Generell war die inflammatorische Reaktion zehn Tage nach der Operation rückläufig. Während in der Vergleichsgruppe zwar eine Reduktion des Entzündungsbereichs zu vermerken war, konnten in der BMP-2-Gruppe kaum noch Entzündungszellen im Osteotomiebereich erfasst werden.

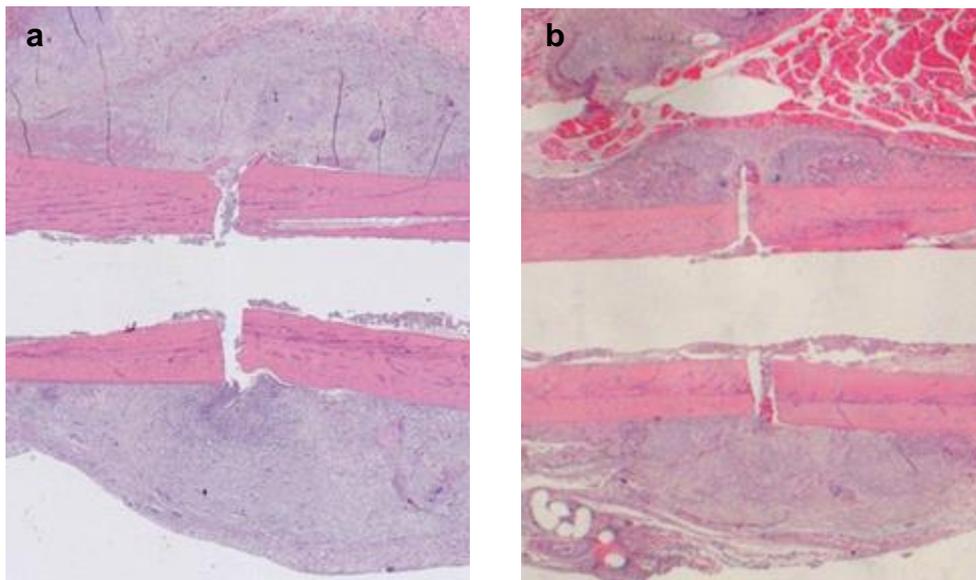


Abb. 21: Sagittale histologische Schnitte der Färbung Hämatoxylin-Eosin im Gruppenvergleich
Exemplarische Gewebsschnitte (a) der Kontrollgruppe und (b) der Therapiegruppe 10 d nach der Osteotomie

Zehn Tage nach dem Eingriff waren die Knorpelinseln lateral der Osteotomie bei der BMP-Gruppe deutlich größer als am fünften postoperativen Tag. Dabei hatte sich die Knorpelansammlung an den Kortizes bereits teilweise in Geflechtknochen umgebaut. Die Ausdehnung dieser Knochenmanschette reichte bis an den Osteotomiespalt

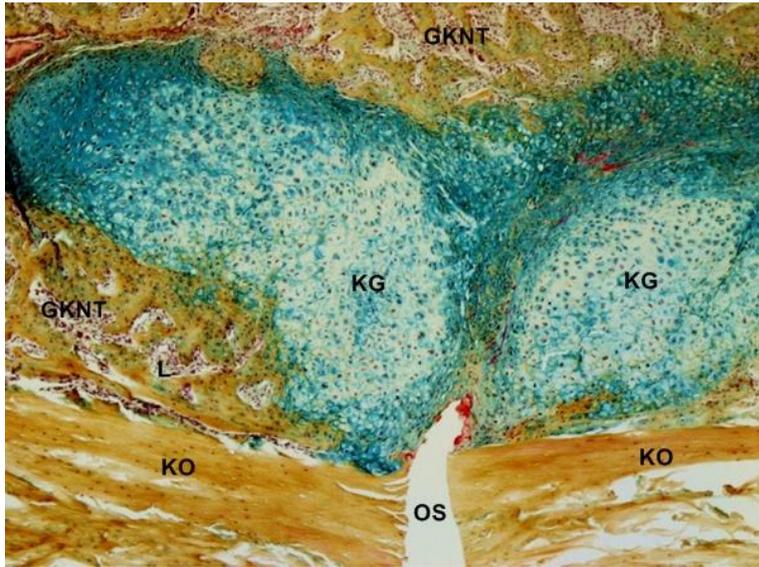


Abb. 22: Früher Kallus

Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, Movat-Pentachrom-Färbung, 5x Vergrößerung. Dargestellt ist der Osteotomiespalt (OS) mit umliegendem Weichteilkallus. Der Kallus besteht vorwiegend aus Knorpelgewebe (KG). An den Kortizes (KO) hat sich Geflechtknochen angelagert. Dieser besteht aus Geflechtknochenstrahlen (GKNT) und Lakunen (L).

Abb. 23: Knorpelgewebe

Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, Alcianblau-/Kernechtrot-Färbung, 20x Vergrößerung.

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer Knorpelinsel, die neben der Osteotomie lokalisiert ist. Der hyaline Knorpel ist auf der rechten Seite des Bildes intensiv blau gefärbt. Auf der linken Bildhälfte beginnt die Knorpelmatrix zu verknöchern, erkennbar an der hell-rosa Färbung. Die Chondrozyten sind blasenartig aufgetrieben und gehen zugrunde. Teilweise sind nur noch Zellreste zu erkennen.

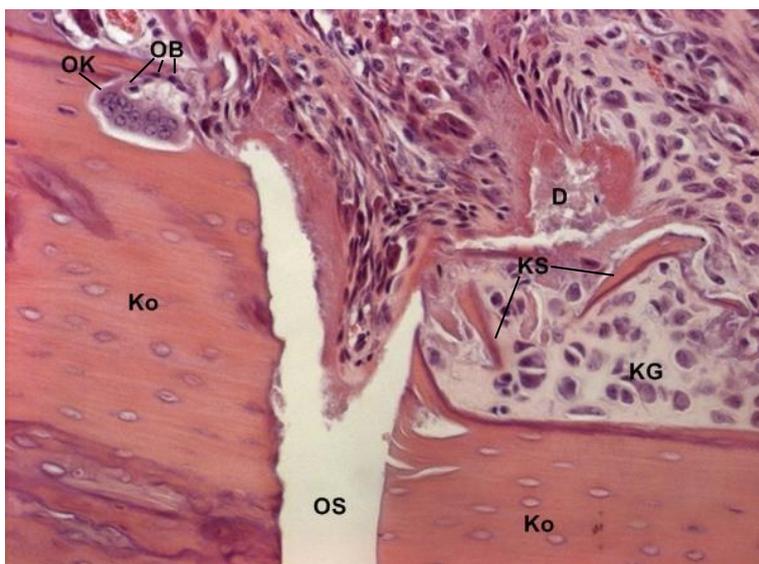
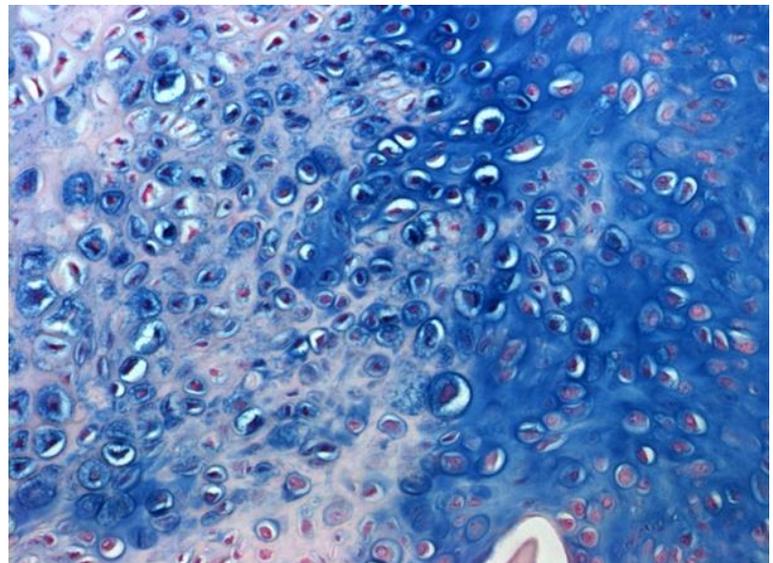


Abb. 24: Osteotomiespalt

Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, HE-Färbung, 20x Vergrößerung.

Dargestellt ist eine vergrößerte Ansicht auf den Osteotomiespalt (OS). An die Kortikalis (Ko) hat sich Knorpelgewebe (KG) angelagert. Neben dem Osteotomiespalt sind zwei Knochensplitter (KS) zu erkennen. In unmittelbarer Umgebung liegt eine Ansammlung von Zelltrümmern, Detritus (D). Des Weiteren sind eine Howship'sche-Lakune mit einem Osteoklast (OK) und mehreren Osteoblasten (OB) in der Vergrößerung zu sehen.

heran (Abb. 22). Im Zentrum der Knorpelinseln am Osteotomiespalt lagen hypertrophierte Chondrozyten und Blasenknorpel in der Knorpelmatrix, welche bereits teilweise verknöchert war (Abb. 23). Bei genauerer Betrachtung des trabekulären Kallus fiel auf, dass an der Oberfläche der Geflechtknochentrabekel eine Vielzahl an Osteoblasten und Osteoklasten zu finden war (Abb. 24). Die Lakunen in den Zwischenräumen waren mit Bindegewebe gefüllt.

In der Vergleichsgruppe hatte die Knorpelmenge seit dem fünften postoperativen Tag weniger zugenommen als in der BMP-Gruppe. Vor allem hatten sich Knorpelinseln lateral des Osteotomiespalts gebildet. Es hatte sich ebenfalls eine Knochenmanschette ausgebildet, in der jedoch nur wenig Knorpel zu finden war.

Deskriptive Analyse der späten Zeitpunkte

Zu den Zeitpunkten 28, 42 und 84 Tage nach der Osteotomie wurden die sagittalen Schnittpräparate der BMP-Gruppe und der Kontrollgruppe mit der Versilberung nach von Kossa (Abb. 25, 26) und mit Methylgrün/van Gieson (Abb. 27, 28) gefärbt. In der Versilberung nach von Kossa wird mineralisierter Knochen schwarz, Mineralisationsfronten schwarz granuliert und Knorpel- sowie Bindegewebe braun gefärbt. In der Methylgrün/van Gieson-Färbung stellt sich Knochengewebe intensiv rot, Bindegewebe hellrot und Knorpelgewebe blaugrün dar.

Die histologische Beobachtung ergab, dass sich beide Gruppen 28 Tagen post operationem im Heilungsprozess im Sinne einer sekundären Knochenheilung befanden. Dabei zeigte sich weiterhin ein periostaler Kallus am Osteotomiespalt. Eine endostale Kallusbildung war aufgrund des intramedullär implantierten Drahts kaum abgrenzbar.

Nach 28 Tagen wurden die Knochenenden der Osteotomie zwar bei allen Tieren mit dem periostalen Kallusgewebe verbunden, eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts war jedoch nicht zu beobachten.

Nach 42 Tagen war bei der BMP-Gruppe ein weiteres Voranschreiten der Knochenheilung zu verzeichnen. So war zum einen der mineralisierte Anteil am Kallus sichtlich höher als zum früheren Zeitpunkt, zum anderen konnte bei einigen Tieren bereits eine unilaterale Überbrückung des Osteotomiespalts beobachtet werden. Im Vergleich dazu fiel bei der Beurteilung der Übersichtsaufnahmen der Kontrollgruppe eine leichte Vermehrung des bindegewebigen Kallusgewebes auf.

Nach 84 Tagen wurde deutlich, dass in der Kontrollgruppe ein deutlich verzögerter Heilungsverlauf vorlag. An den Knochenenden der Osteotomie war eine Atrophie zu beobachten. Bei den mit BMP-2 therapierten Tieren war nach 84 Tagen bei fast allen Tieren eine unilaterale oder komplette knöcherne Überbrückung in der Übersichtsaufnahme zu sehen. Dabei verringerte sich die Kallusgröße und es kam zu einer Verdichtung des mineralisierten Gewebes. Bei höherer Vergrößerung ließ sich die gewebliche Zusammensetzung des Kallus qualitativ beurteilen.

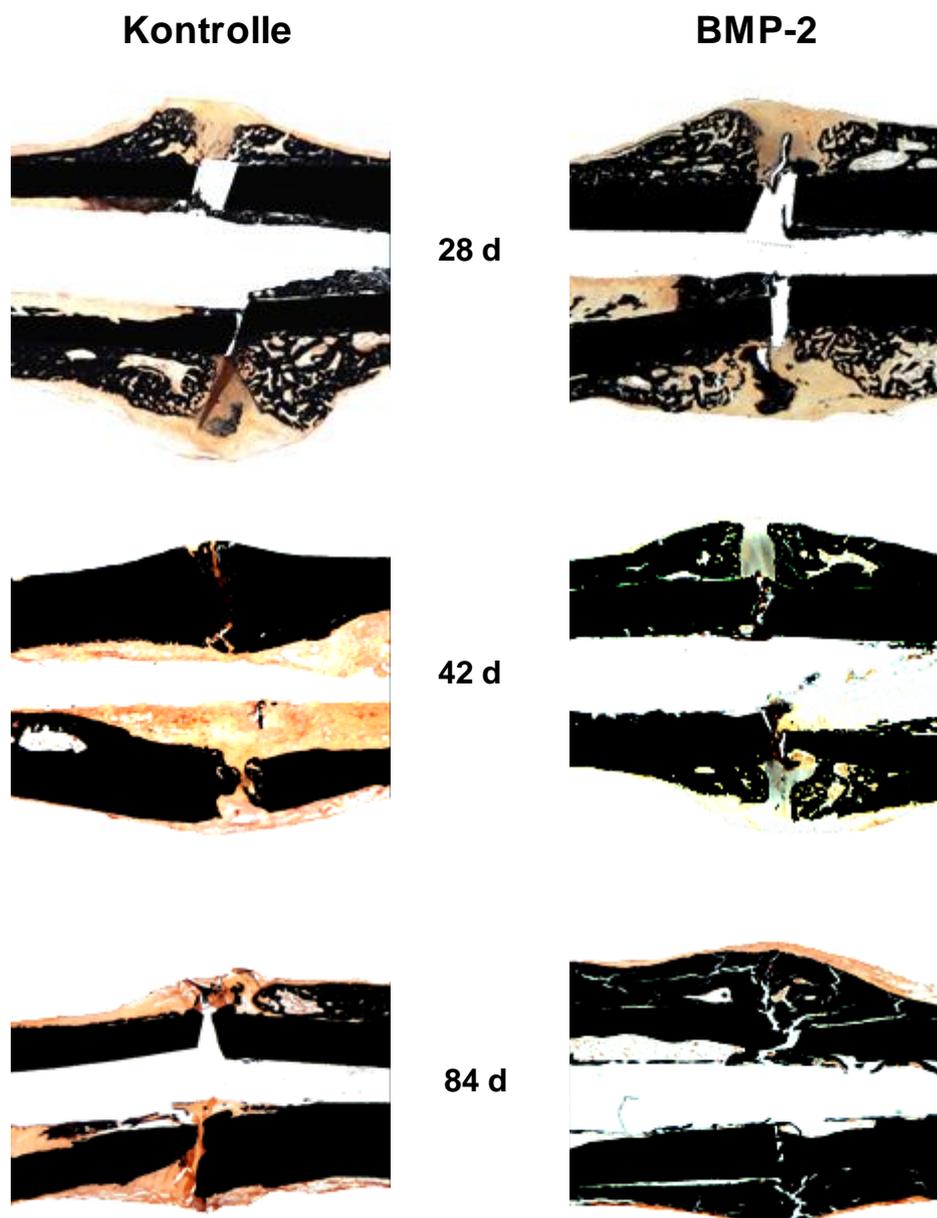


Abb. 25: Exemplarische sagittale histologische Schnittpräparate im Gruppenvergleich nach 28, 42 und 84 Tagen

Übersichtsaufnahmen, gefärbt nach von Kossa

In der von Kossa-Färbung ergab die Beurteilung des Kallus folgende Ergebnisse: Bindegewebige Bereiche färbten sich hellbraun und waren insbesondere im Bereich des Osteotomiespalt festzustellen. Dunkelbraun gefärbtes Knorpelgewebe bildete sich vor allem im periostalen Kallus proximal und distal der Osteotomie aus. Angrenzend an die knorpeligen Areale war großflächig neu gebildetes Knochengewebe als schwarz gefärbte Geflechtknochen trabekel zu erkennen (Abb. 26). Diese Zusammensetzung des Kallus entsprach beiden Gruppen nach 28 Tagen und der Untersuchungsgruppe mit BMP-2 nach 42 Tagen. Bei der Kontrollgruppe war nach 42 Tagen eine Abnahme des neugebildeten Knochens zu sehen. Der bindegewebige Anteil am Kallus nahm hingegen zu. Bei der BMP-2-Gruppe war der Kallus (Geflechtknochen, Knorpel und Bindegewebe) nach 84 Tagen bereits teilweise abgebaut und durch lamellären Knochen ersetzt worden. Somit befand sich die Knochenheilung bereits in der Phase des Knochenumbaus (remodeling).

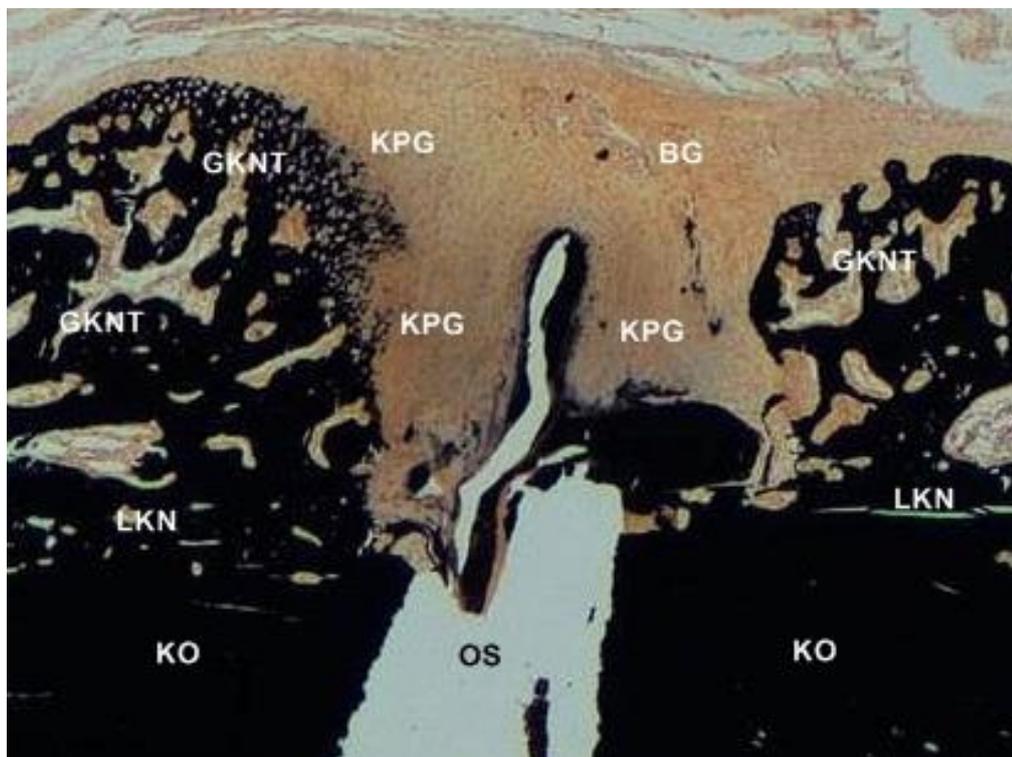


Abb. 26: Gewebzusammensetzung im Kallus 28 Tage nach der Osteotomie

Exemplarisches histologisches Schnittpräparat eines Kallus der BMP-2 Gruppe 28 Tage postoperativ; Ausschnittsvergrößerung 10x, gefärbt nach von Kossa. BG: Bindegewebe, OS: Osteotomiespalt, GKNT: Geflechtknochen trabekel, KO: Kortikalis, KPG: Knorpelgewebe, LKN: Lamellärer Knochen

In den Methylgrün / van Gieson gefärbten Schnittpräparaten wurde die Morphologie des Knorpel- und Knochengewebes lichtmikroskopisch betrachtet (Abb. 27): Nach 28 Tagen befanden sich bei der BMP-2-Gruppe wie bereits zum früheren Untersuchungszeitpunkt nach zehn Tagen Knorpelinseln lateral der Osteotomie im periostalen Kallusgewebe. Diese bestanden aus vielen Chondronen, der funktionellen Baueinheit des Knorpelgewebes. Ein Chondron umfasste in Gruppen zusammen gelagerte, blau-grün gefärbte Chondrozyten. Zwischen den Chondronen ließ sich die schwächer angefärbte

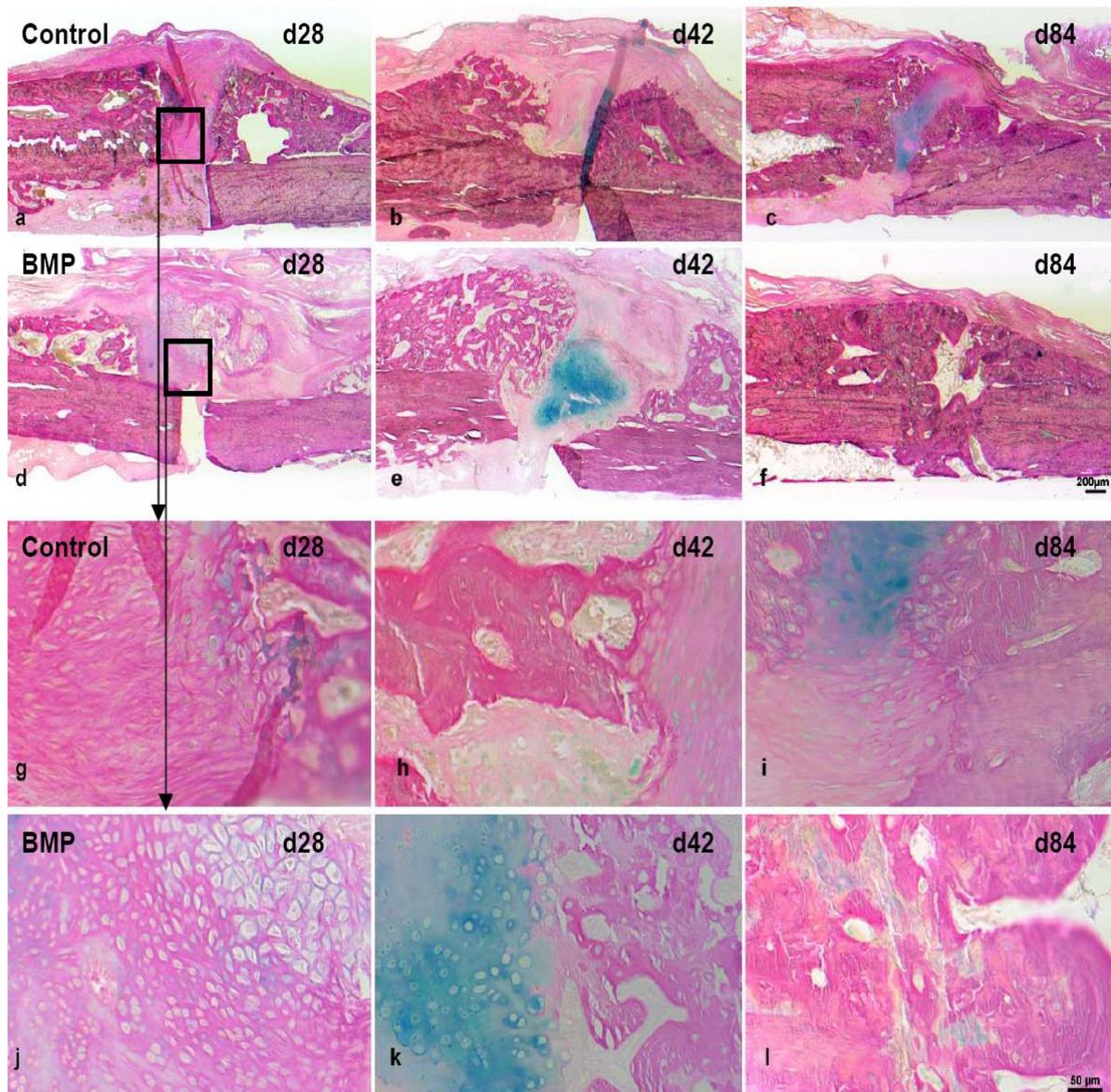


Abb. 27: Exemplarische sagittale Schnittpräparate gefärbt mit Methylgrün-/van Gieson im Gruppenvergleich nach 28, 42 und 84 Tagen.

Exemplarische Darstellung der gefärbten Gewebsschnitte der Kontrollgruppe (a-c;g-i) und der Therapiegruppe (d-f;j-l) zu den Zeitpunkten 28 d; 42 d und 84 d; bei 5-facher Vergrößerung (a-f) und bei 20-facher Vergrößerung (g-l)

Interterritorialsubstanz erkennen (Abb. 28). Der neugebildete Geflechtknochen entstand in Angrenzung an die Knorpelinseln proximal und distal der Osteotomie. Damit war 28 Tage postoperativ die Heilungsphase der enchondralen Ossifikation erreicht. Bei der Vergleichsgruppe mit PDLLA konnte ebenfalls die Bildung von Geflechtknochen proximal und distal der Osteotomie beobachtet werden. Der periostale Kallus, der die Knochenenden miteinander verband, bestand aus fibrinösem Bindegewebe und Knorpelgewebe. Bei einem der Schnitte war nur eine marginale Kallusbildung zu verzeichnen.

Die Analyse der Gewebeschnitte 42 Tage nach der Operation zeigten in der BMP-Gruppe eine Zunahme an Knorpelmasse und Geflechtknochen. Zudem war teilweise bereits ein Umbau von periostal angelagertem Geflechtknochen in Lamellenknochen zu sehen. Bei zwei Tieren konnte eine knöcherne Überbrückung der Osteotomie mit Geflechtknochen beobachtet werden. In der Vergleichsgruppe war der Osteotomiespalt nach 42 Tagen nicht überbrückt und bei einigen Gewebeschnitten fiel eine Atrophie der Knochenenden auf. Des Weiteren war bei der Beurteilung der Kallusse der

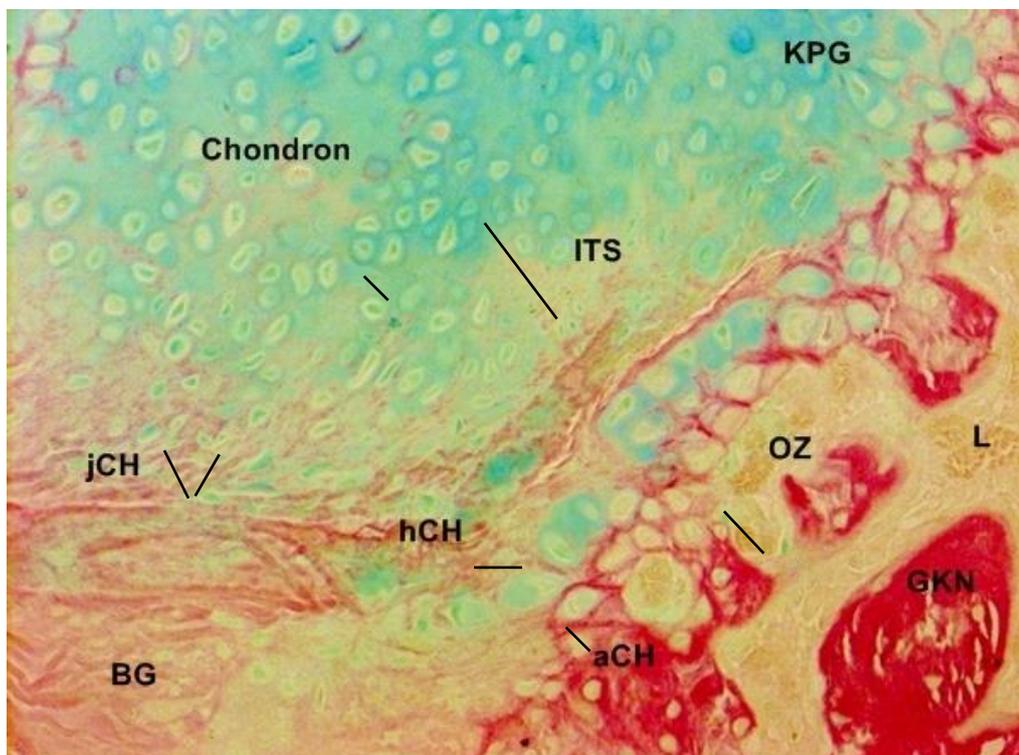


Abb. 28: Darstellung der Knorpelmorphologie nach 42 Tagen

Exemplarisches sagittales Schnittpräparat eines Kallus aus der BMP-2-Gruppe nach 42 Tagen. Färbung: Methylgrün/ van Giesson. BG: Bindegewebe; KPG: Knorpelgewebe; jCH: junger Chondrozyt; hCH: hypertropher Chondrozyt; aCH: apoptotischer Chondrozyt; ITS: Interterritorialsubstanz; GKN: Geflechtknochen; L: Lankune; OZ: Osteozyt.

Kontrollgruppe eine Zunahme an Knorpel- und Bindegewebe zu beobachten. Bei einigen Schnitten fiel jedoch auch eine Volumenabnahme des Kallus auf.

84 Tage nach der Osteotomie ergab die Betrachtung der Kallusse, die mit BMP-2 behandelt wurden, dass bei allen Schnitten der Osteotomiespalt zumindest unilateral mit Geflechtknochen ausgefüllt war. Das Knorpelgewebe wurde fast vollständig durch Geflechtknochen ersetzt. Aufgrund des fortschreitenden Umbaus von Geflechtknochen in lamellären Knochen war die periostale Kallusgröße im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten deutlich rückläufig. Bei der Kontrollgruppe zeigte sich auch in den Gewebsschnitten nach 84 Tagen keine knöcherne Überbrückung der Osteotomie. Der periostale Kallus war insgesamt gering ausgeprägt jedoch größer als bei der BMP-Gruppe zu dem Zeitpunkt. Es konnte eine vermehrte Ausbildung von Geflechtknochen und Knorpelinseln im Kallus beobachtet werden. Zum Teil wurde allerdings deutlich, dass die Knochenheilung stagniert war. Dabei fiel auf, dass sowohl die Knochenenden als auch der Kallus atrophiert waren und der breite Osteotomiespalt mit Bindegewebe ausgefüllt war.

Insgesamt zeigte sich in der histomorphologischen Begutachtung des Osteotomiekallus der BMP-Gruppe ein Heilungsverlauf von der Reparaturphase bis zur Remodeling-Phase. Damit war die Knochenregeneration zu jedem Untersuchungszeitpunkt weiter vorangeschritten als in der Vergleichsgruppe, in der insgesamt wenig Kallus und Knorpel ausgebildet wurde.

III.5 Histomorphometrie

Auswertung der frühen Zeitpunkte und Immunhistochemie

Die verschieden gefärbten Paraffinschnitte der Kallusse der frühen Heilungsphase (fünf und zehn Tage) wurden nach lichtmikroskopischer Beurteilung am Computer analysiert.

Anhand der sagittalen Übersichtsschnitte, die mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt waren, konnte die Kallusfläche ausgemessen werden. Dabei war eine Zunahme der Kallusgröße in beiden Gruppen von Tag fünf auf Tag zehn zu verzeichnen. Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Messung, dass die BMP-Gruppe zu beiden Zeitpunkten einen kleineren Kallus ausgebildet hatte als die Kontrollgruppe (Abb. 29). In der

Kontrollgruppe war ein hypertropher Kallus entstanden, welcher zehn Tage nach der Osteotomie im Vergleich zur BMP-2-Gruppe eine Fläche von mehr als doppelter Größe maß und sich damit signifikant von der BMP-Gruppe unterschied.

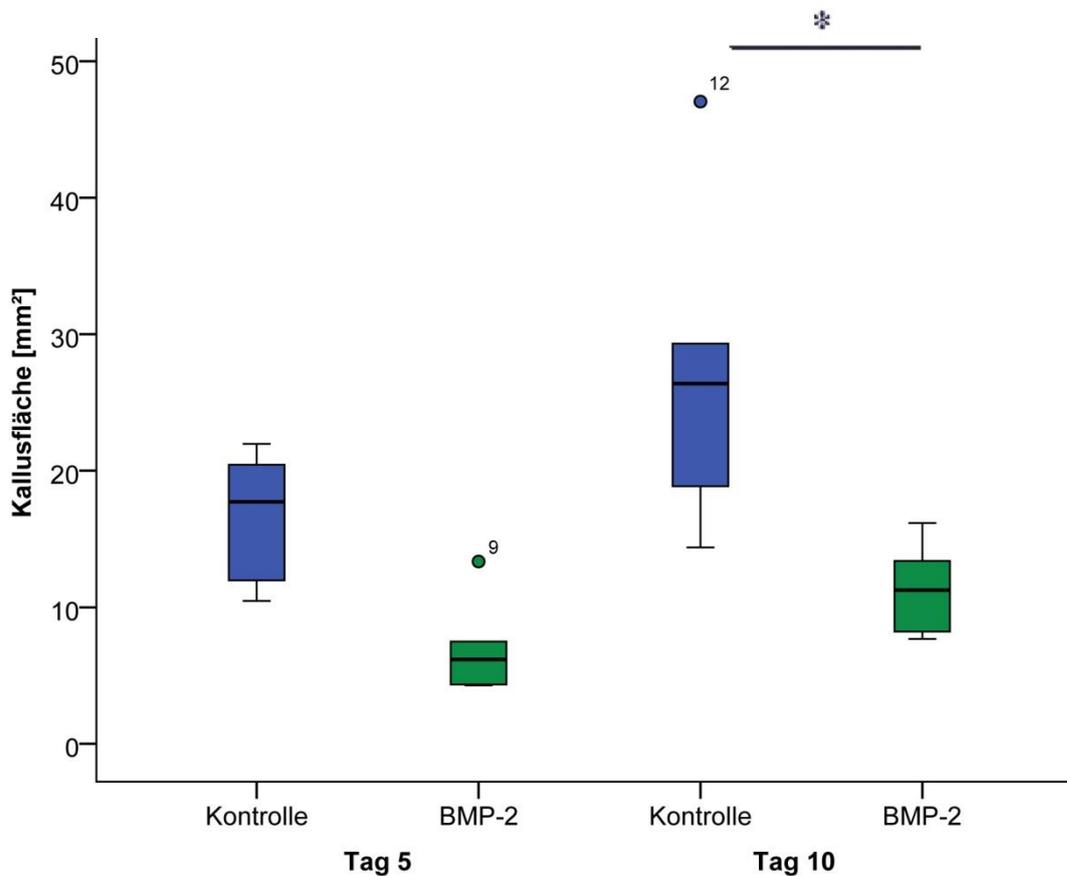


Abb. 29: Graphische Darstellung der Kallusgröße an Tag 5 und Tag 10 im Gruppenvergleich
p-Wert: * =0,004

In beiden Gruppen wurde an der anterioren Tibiakante weniger Kallusgewebe gemessen als an der hinteren Tibiakante. Die Vorderseite der Tibia ist zum einen generell mit wenig Gewebe gepolstert, zum anderen wurde von dieser Seite auch die Osteotomie durchgeführt.

Anhand der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung, die den Knorpel intensiv blau anfärbte, konnte die Knorpelmasse im Kallus quantifiziert werden. Bereits nach fünf Tagen bildete die BMP-Gruppe wesentlich mehr Knorpel anteilig am Gesamtkallus als die Kontrollgruppe. Nach zehn Tagen war diese Entwicklung noch deutlicher, da sich der Knorpelanteil der BMP-Gruppe nahezu versechsfacht hatte. Der Unterschied im

Knorpelanteil zwischen Therapie- und Kontrollgruppe war zu diesem Zeitpunkt signifikant (Abb. 30). Es war zwar auch eine Zunahme des Knorpelanteils in der Kontrollgruppe zu messen, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als bei der BMP-2-Gruppe. Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel eine recht breite Streuung der Messdaten auf, vor allem am zehnten postoperativen Tag.

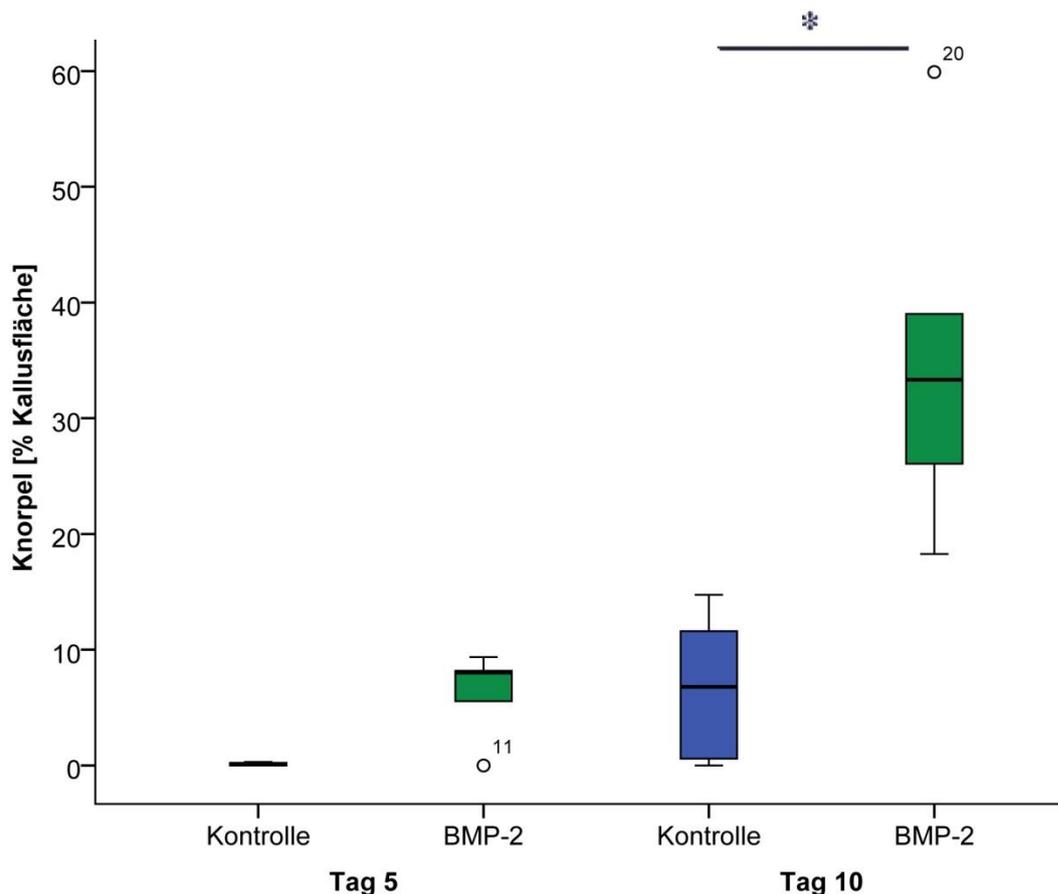


Abb. 30: Graphische Darstellung des Knorpelanteils am Gesamtkallus (%)
p-Wert: * = 0,002

Die immunhistologische Färbung mit dem Antikörper gegen α -sma, welche glatte Muskelzellen in den Gefäßwänden anfärbte, diente der Quantifizierung der Angiogenese im frühen Kallus. Dazu wurden die Gefäße in einer definierten Kallusregion (ROI) ausgezählt und auf die Kallusfläche berechnet. Bereits bei der Auswertung der Schnittpräparate des ersten Untersuchungszeitpunkts (fünf Tage) fiel eine höhere Gefäßdichte im Kallus der Kontrollgruppe auf. Während bei der BMP-Gruppe der mediane Wert der ausgezählten Gefäße bei 35,6/ mm² lag, wurden in der Kontrollgruppe 46,9 Gefäße pro mm² gezählt

Nach 10 Tagen war eine signifikant geringere Gefäßdichte im Kallus der BMP-Gruppe vorhanden (Abb. 31). In der BMP-Gruppe hatte sich die Anzahl der Gefäße pro mm² im Vergleich zum früheren Untersuchungszeitpunkt beinahe halbiert (18,1 Gefäße/mm²). In der Kontrollgruppe war indes auch eine reduzierte Gefäßdichte nach zehn Tagen zu beobachten. Die Auszählung ergab hier einen medianen Wert von 35,6 Gefäßen/mm².

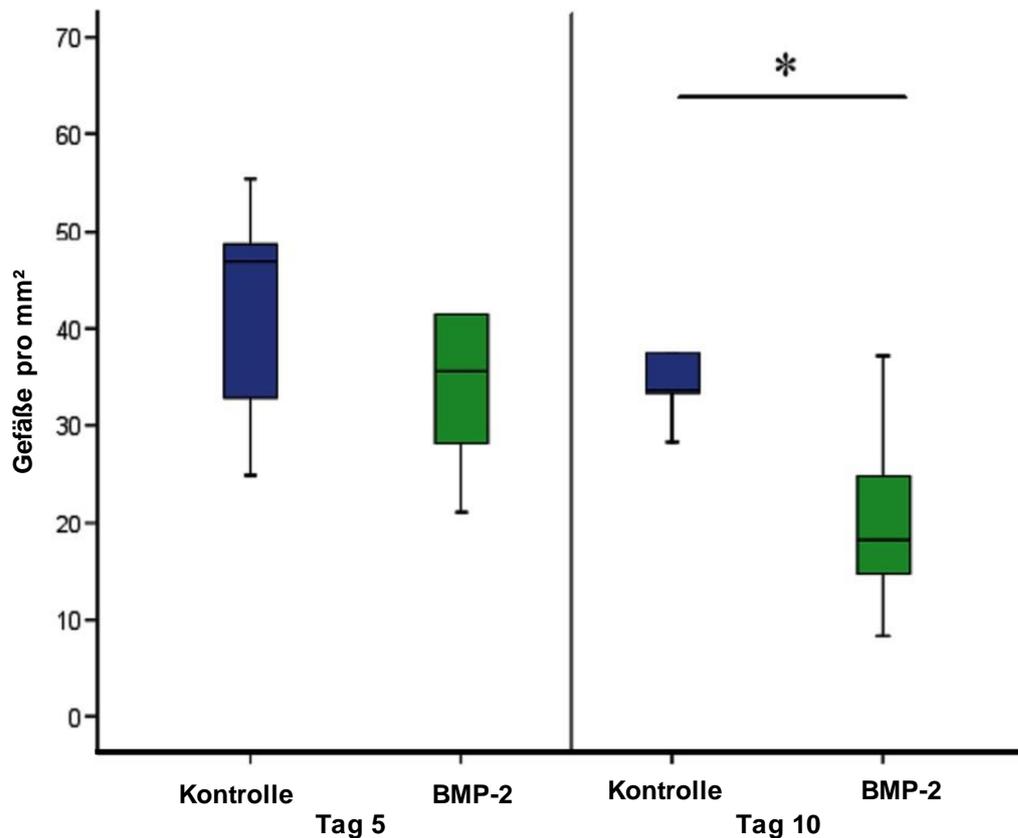


Abb. 31: Graphische Darstellung der Vaskularisierung des Kallus (Gefäße/mm²)
p-Wert: * = 0,025

Auswertung der späten Zeitpunkte

Mittels der computergestützten histomorphometrischen Auswertung wurden in den histologischen Schnittpräparaten die Regionen des Osteotomiekallus (periostaler und endostaler Kallus sowie Gesamtkallus) und die Kortizes sowie der Tibiadurchmesser getrennt quantitativ ausgewertet. Die in der Bildanalyse erhobenen Ergebnisse werden

im Folgenden in tabellarischer Form als Median-Werte angegeben oder graphisch in Form von Boxplots dargestellt.

Die Werte für die Tibiadurchmesser nahmen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der BMP-Gruppe im zeitlichen Verlauf zu. Dabei waren zwischen den Versuchsgruppen mit PDLLA und BMP-2 zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten keine großen Unterschiede bemerkbar (Tab. 9).

Tab. 9: Darstellung des Tibiadurchmessers (TiDm) [mm]

	28 d	42 d	84 d
	Median (25. – 75. Perzentile)		
Kontrolle PDLLA	2,6 (2,5 – 2,7)	2,6 (2,5 – 2,6)	2,7 (2,6 – 2,8)
BMP-2	2,4 (2,1 – 2,4)	2,4 (2,4 – 2,5)	2,6 (2,5 – 2,7)

Der knöcherne Anteil der Kortikalis war in der BMP-2-Gruppe nach 28 Tagen prozentual am größten und wurde nach 42 und 84 Tagen geringer (Tab. 10).

Tab. 10: Darstellung des mineralisierten Anteils an der Kortikalis (CtMdBAr/CtAr) [%]

	28 d	42 d	84 d
	Median (25. – 75. Perzentile)		
Kontrolle PDLLA	95,6 (95,4 – 96,6)	95,7 (94,7 – 96,7)	93,0 (87,3 – 94,9)
BMP-2	94,8 (94,1 – 95,5)	92,3 (90,9 – 95,2)	93,2 (91,2 – 94,4)

Aufgrund der intramedullär implantierten Kirschner-Drähte war der endostale Kallus in allen Gruppen nur sehr gering ausgebildet und es ergaben sich nur minimale Messwerte. Da die Ergebnisse für den periostalen Kallus und den Gesamtkallus nahezu identisch waren, werden im Folgenden nur die Ergebnisse des periostalen Kallus beschrieben.

Der Kallus der BMP-Gruppe war nach 28 Tagen größer als in der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war jedoch eine stetige Abnahme der Kallusfläche zu den vorangeschrittenen Zeitpunkten zu beobachten. Nach 84 Tagen hatten sich die medianen Werte der Kallusfläche sogar angeglichen (Tab. 11).

Tab. 11: Darstellung des periostalen Kallus (PsCaAr) [mm²]

	28 d	42 d	84 d
	Median (25. – 75. Perzentile)		
Kontrolle PDLLA	8,3 (8,2 – 10,6)	8,0 (4,6 – 12,4)	7,4 (6,7 – 10,7)
BMP-2	9,7 (9,4 – 10,5)	8,4 (6,3 – 10,4)	7,4 (6,4 – 8,9)

Des Weiteren wurde die Mineralisation des Kallus histomorphometrisch berechnet. In beiden Gruppen war eine stetige Zunahme der Mineralisierung des Kallus nach 42 und 84 Tagen zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass der knöcherne Anteil am Kallus zu jedem der analysierten Zeitpunkte in der BMP-Gruppe größer war als in der Kontrollgruppe (Abb. 32). Dabei unterschied sich die BMP-2-Gruppe 42 Tage nach Osteotomie sogar signifikant von der Referenzgruppe mit gleicher Standzeit.

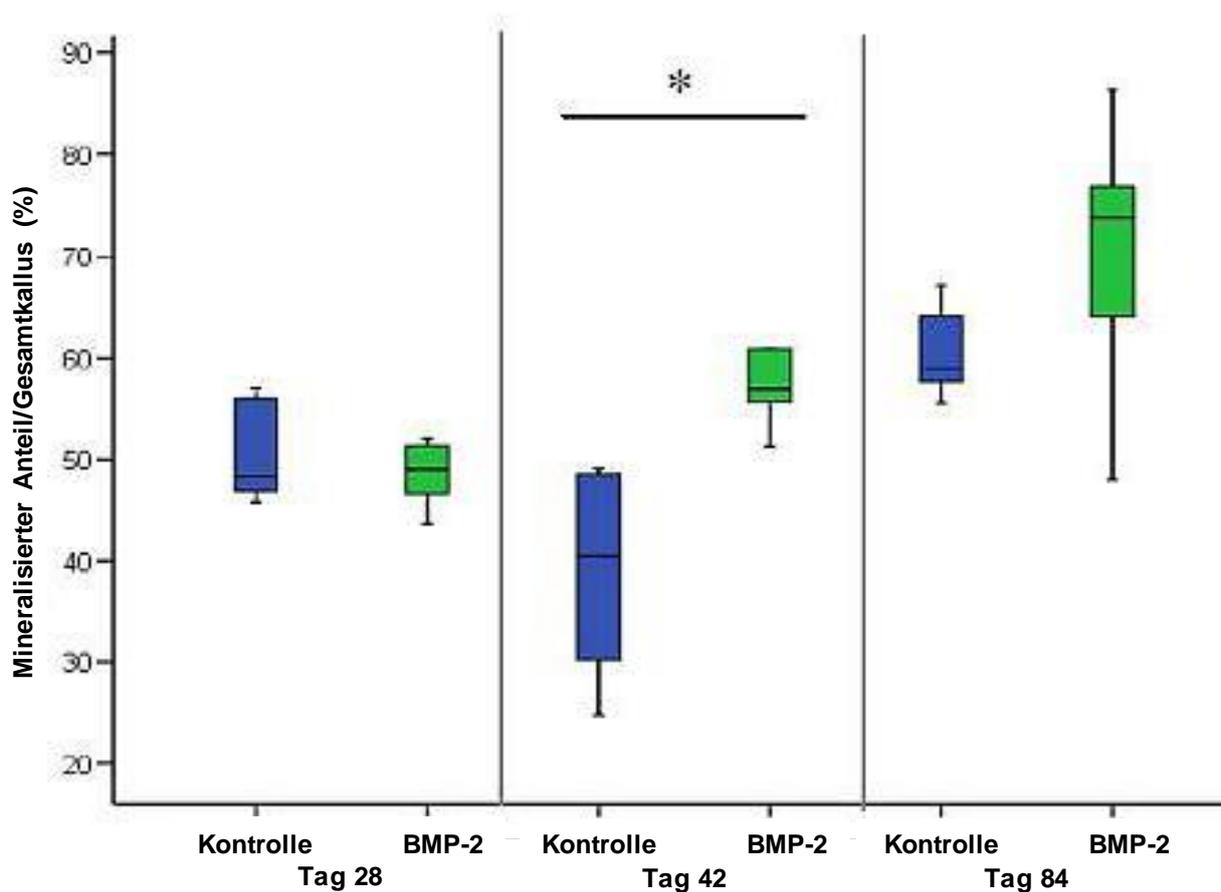


Abb. 32: Mineralisierter Anteil am Gesamtkallus (%)

p-Wert: * = 0,004

Die mit Methylgrün / van Gieson gefärbten Schnitte dienten der Bemessung des Knorpelanteils am Gesamtkallus. In der BMP-Gruppe wurde der höchste Knorpelanteil nach 42 Tagen gemessen. Nach 84 Tagen war der Knorpel fast vollständig durch mineralisierten Knochen ersetzt. Hingegen wurde in der Kontrollgruppe nach 84 Tagen der höchste Wert für den Knorpelanteil ermittelt. Dabei zeigten sich jedoch keine konstant zunehmenden sondern eher schwankende Messdaten für den Knorpelanteil. Insgesamt wurde zu den späten Untersuchungszeitpunkten in der BMP-Gruppe weniger Knorpel anteilig am Gesamtkallus gebildet als in der Kontrollgruppe (Tab.12).

Tab. 12: Darstellung des Knorpelanteils am periostalen Kallus (CgAr/PsCaAr) [%]

	28 d	42 d	84 d
	Median (25. – 75. Perzentile)		
Kontrolle PDLLA	6,2 (4,2 – 7,0)	4,6 (1,7 – 10,7)	6,9 (1,9 – 12,1)
BMP-2	3,7 (3,5 – 4,0)	7,1 (2,3 – 9,7)	0,3 (0,2 – 0,5)

IV DISKUSSION

Die Therapie von Knochenheilungsstörungen und insbesondere Pseudarthrosen ist mit den etablierten Behandlungsmethoden nicht immer erfolgreich. In den letzten Jahrzehnten stand vor allem die Entwicklung von neuen Osteosynthesen, die eine optimale mechanische Stabilität im Defektgebiet gewährleisten, im Fokus der unfallchirurgischen Forschung. Zunehmend wurde dabei auch die Biologie der Knochenheilung berücksichtigt. Besonders das Periost sowie das Knochenmark spielen bekanntermaßen eine Schlüsselrolle in der Knochenregeneration. Mit gewebeschonenden Operationen und weiterentwickelten Osteosynthesen konnten in der Behandlung von Knochendefekten gute Erfolge erzielt werden. Trotz der optimierten Implantatsysteme kommt es jedoch noch häufig zur Entstehung von Pseudarthrosen. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben der Knochenheilung könnte eine unzureichende biologische Stimulierung im Defektgebiet sein. Einen Lösungsansatz dazu bietet die Behandlung mit heilungsstimulierenden Wirkstoffen. Mit der Entdeckung der Wachstumsfaktor-Gruppe Bone Morphogenetic Proteins eröffnete sich eine neue Möglichkeit in der Behandlung und Prävention von beeinträchtigter Knochenheilung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kirschner-Drähte mit einem Gemisch aus 50 µg BMP-2 und dem biodegradierbarem Polyaktid PDLLA beschichtet. Die beschichteten Drähte wurden intramedullär in eine standardisiert generierte Osteotomie der Rattentibia eingesetzt. Dabei diente der Kirschner-Draht der mechanischen Stabilisierung und zugleich der lokalen Applikation des Wachstumsfaktors.

Das von Kratzel et al. etablierte Tiermodell einer verzögerten Knochenheilung, welche durch eine Osteotomie der Rattentibia generiert wurde, diente als Vergleichsgruppe für die vorliegende Studie. Das Studiendesign umfasste 48 Versuchstiere und einen Untersuchungszeitraum von 84 Tagen. Zur Untersuchung der frühen Heilungsphasen (fünf und zehn Tage) wurden die Knochen histologisch aufgearbeitet um die Zusammensetzung des frühen Kallus zu untersuchen. Zudem erfolgte eine immunhistochemische Färbung zur Darstellung der Vaskularisierung. Nach 28, 42 und 84 Tagen wurden biomechanische, histologische und histomorphometrische Untersuchungen an den osteotomierten Tibiae durchgeführt. Zur klinischen

Verlaufskontrolle erfolgten regelmäßige Körpergewichtsmessungen der Versuchstiere sowie Röntgenaufnahmen in konventioneller Technik.

IV.1 Ergebnisse

Die vorliegenden biomechanischen, radiologischen und histomorphometrischen Ergebnisse lassen erkennen, dass 50 µg lokal appliziertes BMP-2 einen stimulierenden Einfluss auf die Heilung der Tibia-Osteotomie bei Ratten hat.

In der biomechanischen Testung bewirkte die Applikation des BMPs vom intramedullären Kirschner-Draht eine signifikant gesteigerte mechanische Stabilität des Osteotomiekallus nach 28 und 42 Tagen. So konnte unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors das maximale Drehmoment nach 42 Tagen um über 100 %, die torsionale Steifigkeit um circa 130 % im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden. In vielen experimentellen Studien ist belegt, dass BMP-2 die normale Knochenheilung beschleunigt und die biomechanische Stabilität des Kallus erhöht (Schmidmaier 2002, Lissenberg-Thunnissen 2011). In einer vorangegangenen Studie von Bouxsein et al. konnte gezeigt werden, dass die mechanische Stabilität einer ulnaren Osteotomie bei Kaninchen durch eine BMP-2-Applikation mit einem Kollagenschwamm deutlich gesteigert werden konnte (Bouxsein 2001). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine BMP-2-Applikation von einem beschichteten Draht in einem Modell mit beeinträchtigter Knochenheilung eine effektive Steigerung der Kallusstabilität erzielen kann.

Die Auswertung der radiologischen Kontrollen mittels des Röntgenscores ergab bei den mit BMP-2 behandelten Tieren eine fortgeschrittenere Konsolidierung der Osteotomie als bei der unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse werden durch die biomechanischen Resultate gestützt und scheinen auf einer vermehrten ossären Durchbauung des Osteotomiekallus zu beruhen.

Auch die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen stützen die These der stimulierten Kallusreifung durch BMP-2. Es zeigte sich, dass die Knochenheilung der BMP-Gruppe zu jedem Zeitpunkt weiter vorangeschritten war als die der Kontrollgruppe. In der frühen Phase der Knochenheilung bildete die BMP-Gruppe einen moderaten Kallus um die Osteotomie. Darin befanden sich wenige inflammatorische Zellen in direkter Umgebung des Osteotomiespalts. Die Kontrollgruppe hingegen bildete

in der frühen Heilungsphase einen hypertrophen Kallus aus, welcher vor allem Bindegewebe und viele Entzündungszellen enthielt. Dies deutet darauf hin, dass in der Kontrollgruppe eine ausgeprägtere inflammatorische Reaktion vorlag als in der BMP-Gruppe. Es ist seit langem bekannt, dass die Inflammationsphase die regenerative Heilungskaskade im Knochen einleitet. Es wurde jedoch ebenfalls beobachtet, dass eine verzögerte Knochenheilung oft mit einer prolongierten Entzündungsreaktion einhergeht (Kratzel 2008, Schmidt-Bleek 2011). Inflammatorische Zellen sind vermutlich essenziell für die Knochenregeneration, da sie unter anderem über chemotaktische Stimuli mesenchymale Stammzellen rekrutieren und die Angiogenese stimulieren (Kon 2001, Filbin 2006). Andererseits kann eine ausgedehnte Inflammation auch in der Ausbildung eines funktionslosen Narbengewebes resultieren (Serhan 2005). In einer Studie von Schmidt-Bleek et al. konnte anhand eines Osteotomie-Modells an Schafen gezeigt werden, dass bei einer mechanisch induzierten verzögerten Knochenheilung eine prolongierte inflammatorische Reaktion stattgefunden hat (Schmidt-Bleek 2011). Dabei fiel ein erhöhter T-Zell-Anteil im Osteotomiespalt-umgebenden Hämatom auf. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass neben den dienlichen Effekten der inflammatorischen Zellen bestimmte Immunzellen auch einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung haben. In der vorliegenden Studie konnte unter BMP-Applikation eine ausgeprägte Entzündungsreaktion verhindert werden. Eine eindeutige Erklärung dafür ist schwer zu finden. Zum einen scheint eine anti-inflammatorische Wirkung des BMP denkbar, andererseits ist die prolongierte Inflammation in der Kontrollgruppe möglicherweise nur eine Folge der verzögerten Knochenheilung, welche unter BMP-Einfluss beschleunigt wurde.

In der histologischen und histomorphometrischen Auswertung zeigte sich weiterhin, dass der Knorpelanteil zehn Tage nach der Osteotomie in der BMP-Gruppe signifikant höher war als in der Vergleichsgruppe, welche eine sehr geringe Knorpelbildung vorwies. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls auf eine beschleunigte Knochenheilung, welche mit einer verstärkten chondrogenen Differenzierung von MSCs einhergeht (Steinert 2009). Yu et al. zeigten in einer Untersuchung der BMP-Wirkung auf die frühen Phasen der Knochenheilung, dass der Wachstumsfaktor die enchondrale Ossifikation durch die vermehrte initiale Ablagerung von Knorpel- und Knochengewebe beschleunigt (Yu 2010A). Bereits während der frühen inflammatorischen Phase in der Knochenheilung wirkt BMP-2 stimulierend auf die Differenzierung von Osteoblasten und

Chondrozyten (Einhorn 2003). Der Kallus der BMP-Gruppe enthielt zu den späten Untersuchungszeitpunkten nur noch wenig Knorpel- und Bindegewebe. Das größte Knorpelvolumen wurde am zehnten postoperativen Tag gemessen, danach kam es zu einer Reduzierung des Knorpelanteils am Kallus, welcher am letzten Untersuchungstag bei unter einem Prozent lag. In der Kontrollgruppe hingegen wurde der höchste Knorpelanteil am Kallus am letzten Untersuchungszeitpunkt (84 d) gemessen. Diese Ergebnisse bestätigen den deutlich verzögerten Verlauf der Knochenheilung bei den unbehandelten Osteotomie-Tieren.

Die Untersuchung des knöchernen Kallus zu den späteren Zeitpunkten zeigte, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Mineralisierung im Kallus vorlag. Dies spiegelte sich in der lichtmikroskopischen Beobachtung im hohen Anteil an Geflechtknochen und dessen zunehmendem Umbau in Lamellenknochen wider. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass BMP-2 ein hohes osteoinduktives Potential besitzt und die Bildung von mineralisiertem Gewebe induziert (Bostrom 1998). Das vermehrte Vorkommen von mineralisiertem Kallusgewebe erklärt auch die besseren Ergebnisse der BMP-Gruppe in der biomechanischen Testung.

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung ergab, dass im frühen Kallus der Kontrollgruppe eine Hypervaskularisierung vorlag. Diese zeigte sich als überschießende Reaktion, gekennzeichnet durch die Bildung eines hypertrophen Kallus, der viele Entzündungszellen enthielt und zudem eine extensive Angiogenese vorwies. Als ursächlich dafür könnten entzündliche Geschehnisse aufgrund einer subklinischen Infektion oder eine prolongierte reaktive Phase, die mit einer verstärkten initialen Neovaskularisierung einhergeht, angesehen werden (Kratzel 2008). In der BMP-Gruppe wurden keine Anzeichen für eine vermehrte Entzündung oder Hypervaskularisierung gefunden.

Es ist seit längerem bekannt, dass BMPs eine wichtige Rolle in der Angiogenese und auch der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen spielen (David 2009). Beispielsweise stehen Mutationen des BMP-2-Rezeptors im Zusammenhang mit pulmonaler arterieller Hypertension (Machado 2001). Des Weiteren ist die vaskuläre Kalzifizierung mit BMP-2 assoziiert (Rennenberg 2010).

Angiogenese bzw. Neovaskularisierung ist die Aussprossung neuer Kapillaren aus einem bestehenden Gefäßsystem. In vorangegangenen Untersuchungen wurde

festgestellt, dass BMP eine erhöhte Gefäßdichte während der späten Reparaturphase der Fraktur bewirkt (Yu 2010A). Dabei sei die Neovaskularisierung durch BMP vor allem mit der zunehmenden Knochenablagerung im Kallus assoziiert (Suwa 1998). Besonders die Aktivierung des BMP-Signalwegs in Osteoblasten kann eine vermehrte Angiogenese im Knochengewebe induzieren (Zhang 2009). Osteoblasten produzieren den Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), welcher stimulierend auf die Angiogenese wirkt (Deckers 2002). In einer aktuellen Studie untersuchten Yu et al. die Zellen des Frakturkallus zu verschiedenen Zeitpunkten mittels immunhistochemischer Methoden auf die Expression von BMPs (Yu 2010B). Dabei stellten sie fest, dass Komponenten des BMP-Signalwegs während der Phase des harten Kallus in den endothelialen Zellen von Blutgefäßen, die an neugebildeten Knochen angrenzten, exprimiert wurden. Im frühen Kallus hingegen konnte keine BMP-Expression in Blutgefäßen detektiert werden. Die Wirkung von BMP auf die frühe Angiogenese wurde von Cannon und Kollegen untersucht, indem sie bei Zebrafischen BMP selektiv durch ein Dorsomorphin-Derivat blockierten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass BMP in der frühen Gefäßbildung in Zebrafischen abkömmlich ist und eventuell nur auf die Reifung von Gefäßzellen wirkt (Cannon 2010).

All diese Erkenntnisse stützen die These, dass BMP die Angiogenese in Korrelation mit der Knochenneubildung im Kallus stimuliert (Yu 2010A). Ob die beschriebenen Wirkungen von BMP auf die Angiogenese ein direkter Effekt oder eher ein indirekter Effekt über eine erhöhte Ausschüttung pro-angionetischer Faktoren wie VEGF ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Suzuki 2008, David 2009, Emes 2010).

In der vorliegenden Arbeit war die Gefäßdichte der BMP-Gruppe im Kallus geringer als in der Kontrollgruppe. Die Gründe hierfür liegen zum einen darin, dass in der Kontrollgruppe eine Hypervaskularisierung vorlag. Zum anderen scheint BMP eher in der späten Reparaturphase, gekoppelt an die Mineralisierung des Kallus, stimulierend auf die Angiogenese zu wirken (Yu 2010A). Die immunhistochemische Untersuchung zur Quantifizierung der Gefäßdichte wurde in dieser Arbeit jedoch nur am frühen Kallus, fünf und zehn Tage nach der Osteotomie, vorgenommen und ergab, dass die lokale Applikation von BMP-2 auf das Osteotomie-Modell mit beeinträchtigter Knochenheilung eine Verminderung der Hypervaskularisierung im frühen Kallus erzielte.

Insgesamt belegen die vorliegenden Ergebnisse, dass die lokale Applikation von BMP-2 mittels eines beschichteten Drahts einen heilungsfördernden Einfluss auf eine Osteotomieheilung mit beeinträchtigter Knochenheilung zeigt. Dabei bewirkt der Wachstumsfaktor eine frühere Bildung von Knorpel und einen schnelleren Umbau von Weichteil- in Knochengewebe.

IV.2 Nebeneffekte und mögliche Komplikationen

In der vorliegenden Arbeit war als mögliche Nebenwirkung der lokalen BMP-2-Applikation bei sechs von 36 behandelten Tieren das Auftreten von Exostosen an der Drahteintrittsstelle zu beobachten. Exostosen können bei Mikroverletzungen durch verstärkte mechanische Belastung zum Beispiel als Fersensporn oder Knochensporn am Ansatz einer stark beanspruchten Sehne entstehen (Cole 2005, Schöffl 2010). Die proximale Tuberositas Tibiae ist jedoch bei dem Versuchstier Ratte keine exponierte oder stark durch Sehnenzug belastete Stelle. Es ist naheliegend, dass die dort entstandenen Exostosen entweder als hyperplastische Reaktion des Periosts auf die Nagelung oder durch vom beschichteten Kirscher-Draht gelöstes BMP beim Verschieben des Drahts in den vorgebohrten Markraum entstanden sind. Da in der Kontrollgruppe kein Vorkommen von Exostosen beobachtet wurde, ist wahrscheinlich die Wirkung des BMPs als ursächlich für das ektope Knochenwachstum anzusehen. Zudem war eine Häufung von Exostosen in den Röntgenaufnahmen nach 42 Tagen zu vermerken. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das BMP vom Draht freigesetzt. Nach 84 Tagen war anhand der konventionellen Röntgenbilder zu bemerken, dass die Anzahl der Exostosen abgenommen hatte und auch das Ausmaß des zusätzlichen Knochenwachstums reduziert war. Diese Erkenntnisse stützen ebenfalls die These, dass die Exostosen als eine Nebenwirkung des BMPs zu verstehen sind. Allerdings kam es in einem ähnlichen Versuch von Schmidmaier et al., in dem ebenfalls eine intramedulläre Nagelung mit BMP-2-PDLLA-beschichteten Drähten verwendet wurde, zu keinem ektope Knochenwachstum in einem Zeitraum von 42 Tagen (Schmidmaier 2002). Somit kann die Ursache für die Entstehung der Exostosen in der BMP-Gruppe nicht eindeutig geklärt werden.

Ektope Knochenformation und überschießende Knochenbildung sind bekannte unerwünschte Wirkungen von BMP-2 (Benglis 2008). Unter anderem deshalb wird der

Einsatz des für die Behandlung von offenen Tibiafrakturen und bestimmten wirbelsäulenchirurgischen Eingriffen zugelassene InductOs™ (rhBMP-2) immer wieder neu diskutiert (Epstein 2011). Vor allem in der Neurochirurgie kann der Off-Label-Use von rhBMP-2 folgeschwer sein, wenn ektopes Knochenwachstum Nervenbahnen komprimiert und somit für neurologische Ausfälle sorgt (Wong 2008).

Weiterhin fiel bei der Aufarbeitung der Knochenpräparate der feste Sitz des intramedullären BMP-2-beschichteten Drahts im Markraum auf. Während sich der implantierte Draht leicht aus den instabilen Tibiae der Kontrollgruppe entfernen ließ, war das Herausdrehen des BMP-beschichteten Drahtes nur mit einem hohen Kraftaufwand möglich. Dies ist möglicherweise auf die osteointegrative Fähigkeit des Wachstumsfaktors zurückzuführen. Da diese Auffälligkeit in der vorliegenden Arbeit nur beobachtet und nicht objektiviert werden konnte, könnte eine objektive Messung der Festigkeit des Drahtsitzes bei einer Weiterentwicklung der Methodik notwendig werden. Käme es zu einem klinischen Einsatz wäre die starke Integration des Drahts im Knochen bei intramedullärer Schienung, die nach einem bestimmten Zeitraum wieder entfernt werden muss, eher problematisch. Es ist allerdings möglich, dass sich der feste Sitz des Drahts nach vollständiger Knochenregeneration wieder lockert. Im vorliegenden Versuch war die Knochenheilung maximal bis zur Remodelling-Phase vorangeschritten und somit kann das Haftungsverhalten des Drahts nach abgeschlossener Heilung nicht beurteilt werden. Auf dem Gebiet Endoprothetik z.B. bei Totalendoprothesen des Knies oder der Hüfte erwies sich die osteointegrative Wirkung von BMP-2-beschichteten Implantaten in einigen Studien als hilfreich um die Verankerung des Implantats im Knochen zu sichern (Thorey 2011).

Ein weiteres generelles Risiko bei operativen Tiermodellen ist die Wundinfektion. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie ein mikrobiologisches Screening durchgeführt. Insgesamt wurde bei der BMP-Gruppe bei zwei von neun Abstrichen eine Keimbesiedlung festgestellt. Da es keine klinischen Hinweise für das Vorliegen einer Infektion, wie Rötung, Schwellung oder Überwärmung, gab, ist eher von einer subklinischen Infektion oder auch einer Kontamination während der Präparation auszugehen. Bei der Kontrollgruppe wurde bei fünf von 18 Abstrichen ein Bakteriennachweis erbracht. Infektionen sind eine häufige Komplikation bei invasiven Tiermodellen. Auch unter sterilen Operationsbedingungen und einem hygienischen postoperativen Umgang mit den Versuchstieren lässt sich eine Verunreinigung der

operierten Extremität aufgrund der arttypischen Verhaltensweisen und Haltung schwer vermeiden. Bei Melcher und Kollegen zeigten sich nach einem ähnlichen operativen Eingriff an Kaninchen sogar noch höhere Infektionsraten als in der Osteotomie-Kontrollgruppe (Melcher 1995). In der vorliegenden Studie sollte die lokale Applikation einer Antibiotika-haltigen Salbe dem Entstehen einer bakteriellen Infektion vorbeugen. Um das postoperative Risiko noch weiter zu senken, könnte eine prophylaktische systemische Antibiose für zukünftige Tierversuche in Betracht gezogen werden. Generell birgt jede Operation das Risiko einer Wundinfektion. Auch bei der chirurgischen Therapie von geschlossenen Tibiafrakturen beim Menschen kann es zu Infektionen kommen (Coles 2000).

IV.3 Tiermodell einer verzögerten Knochenheilung

Dass BMP-2 eine effiziente Stimulation der Knochenheilung bewirkt, konnte bereits in verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien gezeigt werden. Die meisten experimentellen Studien, welche die heilungsstimulierende Wirkung des Wachstumsfaktors untersuchten, benutzten dabei ein normal heilendes Frakturmodell oder ein Defektmodell (Schmidmaier 2002, Betz 2007, Sawyer 2009). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der BMP-Wirkung in einem Modell mit verzögerter Knochenheilung. In der Literatur finden sich jedoch nur wenige etablierte Tiermodelle, die eine beeinträchtigte Knochenheilung simulieren. Dabei werden vor allem folgende Techniken angewandt: große segmentale Knochendefekte (Petite 2000, Little 2005, Tölli 2011), thermische Behandlung der Defektregion (Markel 1995.), instabile Fixierung (Hietaniemi 1995), Kauterisierung des Periosts (Kokubu 2003, Makino 2005, Kaspar 2008) oder eine Kombination dieser Verfahren. Insgesamt spiegeln diese Tiermodelle jedoch nur begrenzt die Wirklichkeit der Entstehung von Pseudarthrosen oder delayed unions in der Klinik wider. Die beeinträchtigte Knochenheilung stellt jedoch eine kritische Situation dar, bei der eine Heilungsstimulation von großer Bedeutung ist.

Das in der vorliegenden Studie verwendete Tiermodell induziert eine verzögerte Knochenheilung aufgrund einer offenen Osteotomie. Es wurde in der Arbeitsgruppe etabliert und es zeigte sich, dass eine Osteotomie der Rattentibia mit intramedullärer Stabilisierung im Vergleich zu einer standardisierten geschlossenen Fraktur in einer

verzögerten Knochenheilung resultierte (Kratzel 2008). Im Vergleich zum physiologisch verheilenden Frakturmodell der Ratte kam es zu keiner vollständigen Knochenheilung nach 84 Tagen. In der biomechanischen Testung zeigten sich die osteotomierten Tibiae deutlich instabiler als die frakturierten Tibiae der Vergleichsgruppe. Histologisch fiel eine prolongierte inflammatorische Phase sowie die Bildung von weniger Knorpel- und mineralisiertem Knochengewebe auf. Die in einem chirurgischen Eingriff generierte Osteotomie der Tibia wäre nach der AO-Klassifikation für Knochenbrüche als Typ 42A3 einzuschätzen, welcher aufgrund der Methodik gleichartig reproduzierbar ist.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Tiermodellen entsteht die verzögerte Knochenheilung durch die offen vorgenommene Osteotomie. Es ist bekannt, dass Osteotomien schlechter beziehungsweise langsamer heilen als Frakturen (Park 1999). Eindeutige kausale Zusammenhänge sind bisher nicht bekannt, aber es werden viele Theorien diskutiert. Eine These beschäftigt sich mit der Schädigung des Periosts durch die Osteotomie. Das Periost beherbergt ebenso wie das Knochenmark pluripotente mesenchymale Stammzellen und Osteoprogenitorzellen, welche eine herausragende Rolle während der Knochenheilung spielen (Ozaki 2000, Augustin 2007). Zudem werden aus dem Periost heilungsstimulierende Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt (Malizos 2005).

Des Weiteren entstehen während der Osteotomie in der Regel Schnittwunden am knochenumgebenden Weichteilgewebe. Gerade bei Operationen an Rattenextremitäten kann es aufgrund der kleinen anatomischen Verhältnisse schnell zu einer Verletzung von Muskelgewebe kommen. Es ist wohlbekannt, dass Weichteiltraumen den Verlauf einer Frakturheilung beeinflussen können (Rommens 1992, Claes 2006). Seit kurzem ist auch bekannt, dass umgebendes Muskelgewebe Progenitorzellen für die Knochenreparatur bereitstellen kann (Henrotin 2011). Zudem können sekundäre Infektionen, wie sie vor allem bei offenen Frakturen vorkommen, systemische Inflammation, wie beispielsweise bei Rheumatoider Arthritis, als auch schmerzbedingte Schonhaltungen die Heilung des Knochens beeinflussen (Claes 2012, Hao 2012).

Ein weiterer Diskussionspunkt für eine verzögerte Knochenheilung nach Osteotomie ist ein möglicher thermischer Schaden am Knochen durch die hohe Umdrehungszahl der Diamantdrehzscheibe und die Reibung am Knochen. Bei Temperaturen ab 56°C kann Knochen durch die Denaturierung von Proteinen geschädigt werden (Matthews 1972). Bei Temperatureinwirkungen von über 70°C wird sogar von extensiven Nekrosen an

kortikalem Knochen berichtet (Eriksson 1984, Augustin 2008). Im angewandten Tiermodell wurde durch die Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung versucht den thermischen Schaden zu minimieren. In der histologischen Auswertung der vorliegenden Studie wurden keine ausgedehnten Nekrosen an der glatt durchtrennten Kortikalis beobachtet.

Ein weiterer Faktor für die beeinträchtigte Knochenheilung im beschriebenen Osteotomie-Modell könnte die intraoperative Spülung sein. Durch das Spülen wird zum einen das Gewebe aus dem durch die Osteotomie eröffneten Markraum entfernt. Zum anderen wird die initiale Blutung weggespült und es kommt zu einer verringerten Hämatombildung im frühen Kallus (Park 1999). Sowohl das Blut als auch das ausgewaschene Knochenmark enthalten für die Knochenheilung wichtige Zellen, die ihrerseits durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren weitere osteogene Zellen anlocken (Mizuno 1990, Wlodarski 1990, Kolar 2010)

Im vorliegenden Modell wurde die Osteotomie mit einem intramedullären Kirschner-Draht versorgt. Diese Versorgung gewährleistete, dass sich die Knochenenden nicht in der horizontalen Ebene gegeneinander verschieben konnten. Eine Rotationsstabilität konnte mit diesem Implantat jedoch nicht gewährleistet werden (Histing 2011). Um diese zu erreichen müsste eine Optimierung der intramedullären Stabilisierung mittels eines Verriegelungsnagels angewandt werden. Beispielsweise entwickelten Garcia et al. den rotationsstabilen LockingMouseNail (Garcia 2011). Unter Verwendung eines solchen Implantatsystems könnte eine mechanische Instabilität als Ursache für die verzögerte Knochenheilung im angewandten Modell mit größerer Sicherheit ausgeschlossen werden. In vorangegangenen Tiermodellen der eigenen Arbeitsgruppe wurden Frakturen der Rattentibia ebenfalls mit einem intramedullären Kirschner-Draht geschient und es kam zu einer unbeeinträchtigten Knochenheilung (Schmidmaier 2001). Möglicherweise bewirkt die glatte Oberfläche der Osteotomie-Enden, welche eine geringere und nicht ineinander greifende Kontaktoberfläche zwischen den Knochenenden bietet, im Vergleich zu den irregulären Bruchstellen von Frakturen eine zusätzliche Instabilität auf Rotationsebene (Park 1999).

Zusammenfassend ist die beeinträchtigte Knochenheilung im Osteotomie-Kontroll-Modell multifaktorieller Genese. Dabei spielt die prolongierte inflammatorische Phase eine entscheidende Rolle bei der Verzögerung der Knochenheilung. Auch im klinischen

Alltag lässt sich für eine verzögerte Knochenheilung und die Entwicklung von Pseudarthrosen bei ausreichender mechanischer Stabilität oft keine eindeutige Ursache für das Entstehen finden (Runkel 2000). Daher ist das Osteotomiemodell als ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Therapieansätzen für eine verbesserte Knochenheilung einzuschätzen.

IV.4 BMP- Applikation

Da BMPs nicht spezifisch das Knochengewebe beeinflussen sondern auch auf andere Zelltypen wirken, ist es von großer Bedeutung, dass die Freisetzung des Wachstumsfaktors kontrolliert und lokal erfolgt, um ungewollte Nebeneffekte zu vermeiden (Otsuka 2010). Eine Zulassung für die klinische Anwendung hat die Applikation von rhBMP-2 mittels eines absorbierbaren Kollagenschwamms bei der Behandlung von akuten offenen Tibiafrakturen sowie der anterioren Lendenwirbelfusion. Ein InductOs-Kit beinhaltet 12mg Dibuterin alfa (BMP-2). Im menschlichen Skelett liegt das BMP-Vorkommen bei circa 1µg/kg Knochen (Bishop 2007). Somit wird bei der Applikation von InductOs eine vielfache Menge der physiologischen BMP-Konzentration in den Körper eingebracht. Da die Herstellung von BMP äußerst kostenintensiv ist, wäre eine geringere effektive Dosis aus ökonomischer Sicht sinnvoll.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren (60-240 min), ist eine prolongierte und kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors notwendig um gute Behandlungserfolge zu erzielen (Zapf 1986, Zioncheck 1994).

Grundsätzlich kann die lokale Applikation von der systemischen Verabreichung eines Wirksubstrats abgegrenzt werden. Die systemische Gabe von Wirksubstanzen zur Knochenregeneration ist vor allem auf dem Gebiet der Vermehrung der Knochenmasse im gesamten Skelettsystem sinnvoll (Varkey 2004). Beispielsweise konnte eine systemische Gabe von BMP-2 bei osteopenen Mäusen eine Verdichtung der Knochenstruktur bewirken (Turgeman 2002). Auf dem Gebiet der Knochendefektheilung bietet eine lokale Applikation folgende Vorteile: höhere lokale Konzentration des Wachstumsfaktors bei geringerer therapeutischer Dosis, dadurch geringerer Kostenaufwand und Reduktion der systemischen Nebenwirkungen. Dazu kann jedoch auf das invasive Einbringen des Wachstumsfaktors an den Knochendefekt nicht verzichtet werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Freisetzung des

Wachstumsfaktors von einem beschichteten intramedullären Draht. Diese Applikationsart bietet den Vorteil, dass eine Eröffnung der Frakturstelle und somit eine zusätzliche Schädigung des umgebenden Weichteilgewebes nicht notwendig sind. Die Effizienz der lokalen Medikamentenfreisetzung von beschichteten Implantaten konnte bereits mit anderen Medikamenten gezeigt werden (Greiner 2008, Pauly 2009).

Die Applikation von Wachstumsfaktoren erfolgt aufgrund der kurzen Halbwertszeit zumeist mittels bestimmter Carrier. Folgende Gruppen an Trägerstoffen sind in der Literatur beschrieben: natürliche Polymere wie Kollagen oder Alginate, anorganische Materialien wie Hydroxylapatit oder Calciumphosphat, synthetische Polymere wie Polyglutaminsäure sowie Kombinationen aus den verschiedenen Substanzgruppen (Haidar 2009). Bislang gilt das Kollagen I aus der Gruppe der organischen Polymere als Goldstandard in der Applikation von BMP. Die Implantation von allogenen/xenogenem Gewebe birgt jedoch immer ein Restrisiko einer immunologischen Reaktion sowie eine mögliche Übertragung von infektiologischen Erkrankungen (DeLustro 1990). Im angewandten Modell wurde der Wachstumsfaktor BMP-2 durch einen PDLLA-beschichteten Draht lokal appliziert. PDLLA gehört zu der Gruppe der synthetisch hergestellten Polymere. Diese bieten den Vorteil, dass sie reproduzierbar sind und steril industriell hergestellt werden können. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit die Polymer-Eigenschaften wie Löslichkeit, Konsistenz und Freisetzungskinetik zu modellieren (Seeherman 2005, Engstrand 2008).

Durch die Einarbeitung von BMP-2 in das Trägermaterial Poly(D,L-Laktid) findet eine kontrollierte Freisetzung statt. Die Freisetzung erfolgt nach einem initialen Peak kontinuierlich über einen Zeitraum von 42 Tagen (Schmidmaier 2001, Strobel 2011). Des Weiteren zeichnet sich PDLLA als Trägersubstanz durch einen geringen Abrieb (<5%) bei mechanischer Belastung aus (Schmidmaier 2001). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Beschichtung von Osteosynthesen, da es vor allem bei der Implantation von Marknägeln zu einer starken Beanspruchung der Nageloberfläche kommt. Der Vorteil von Biomaterialien wie PDLLA ist die gute Materialverträglichkeit. Da eine immunologische Reaktion die Knochenheilung beeinträchtigt, ist eine hohe Biokompatibilität der Trägersubstanz von großer Bedeutung. In mehreren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von PDLLA-beschichteten Implantaten keine unerwünschten Wirkungen wie eine erhöhte Fremdkörperreaktion hervorruft (Schmidmaier 2002, Wildemann 2004, Greiner 2008). Da PDLLA einem

vollständigen Abbau durch Hydrolyse unterliegt, ist eine negative Langzeitwirkung aufgrund persistierender Metabolite im Organismus sehr unwahrscheinlich.

Die beschriebenen Vorteile der PDLLA-Beschichtung begründen ihre bereits erfolgreiche klinische Anwendung in der Applikation von Antibiotika zur Prophylaxe von Implantat-assoziierten Infektionen (Schmidmaier 2006, Vester 2010, Fuchs 2011).

Im angewandten Modell ist anhand der *in vitro* Daten zur Freisetzungskinetik der PDLLA-Beschichtung davon auszugehen, dass das BMP-2 vom beschichteten Kirschner-Draht zu 50% in den ersten beiden Tage nach Implantation freigesetzt wurde (Schmidmaier 2001). Innerhalb von 42 Tagen erfolgte dann eine langsame und kontinuierliche Freisetzung des gebundenen Wachstumsfaktors. Die physiologische Frakturheilung beginnt mit einer inflammatorischen Reaktion, welche die Kaskade der Knochenheilung initiiert. Neben der vermehrten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen erreicht auch die Expression von BMP-2 ihr Maximum circa 24 Stunden nach dem Frakturereignis (Cho 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese frühe BMP-2-Expression ein entscheidender Faktor für die funktionale Heilung des Knochens ist, welches unter anderem durch eine stimulierende Wirkung von BMP-2 auf die Produktion von anderen BMPs begründet werden kann (Bostrom 1995, Marsell 2009). *In vivo* wird BMP-2 im gesamten Heilungsverlauf ausgeschüttet (Phillips 2005). Dabei nimmt die Expression des Wachstumsfaktors mit zunehmender Knochenformation ab und kehrt während der Remodelling-Phase auf das Ausgangsniveau zurück (Gerstenfeld 2003).

Somit entspricht die Freisetzung von BMP-2 in der vorliegenden Studie etwa der physiologischen BMP-2 Expression während der Knochenheilung. Im Falle einer verzögerten Heilung wie im Osteotomie-Modell, bei dem eine prolongierte Inflammationsphase vorliegt, könnte ein späterer Einsatz von BMP eventuell einen zusätzlich positiven Effekt auf die knöcherne Heilung haben (Seehermann 2006, Betz 2007).

IV.5 Ausblick

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation kann die lokale BMP-2 Applikation von einem beschichteten intramedullären Draht eine verzögert heilende Osteotomie der Rattentibia zur Heilung bringen. Es zeigte sich, dass unter der Stimulation von lokal freigesetztem BMP-2 der Heilungsverlauf beschleunigt wurde, sodass es zu einer vermehrten Knorpelbildung und einem raschen Umbau in Knochengewebe kam. Die biomechanischen Testungen konnten zudem die erhöhte Stabilität des mit BMP-behandelten Knochens nachweisen.

Die Beschichtung von Osteosynthesystemen mit heilungsstimulierenden Substanzen ermöglicht eine effektive Beeinflussung von Knochenheilungsstörungen. Dadurch können bei primärer Anwendung eventuell invasive Folgeeingriffe verhindert werden. BMP-2 ist eine gut erforschte Wirksubstanz und verbessert nachweislich die Knochenheilung. Wünschenswert wären weiterführende präklinische Untersuchungen beispielsweise mit einer verzögerten Freisetzung des BMPs, um den richtigen Zeitpunkt für die wirkungsvollste Applikation des Wachstumsfaktors zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurden 50µg BMP-2 von PDLLA-beschichteten Drähten mit einem initialen Peak freigesetzt. Dies bewirkte, dass die primär verzögert heilende Osteotomie regelhaft zur Heilung gebracht werden konnte. Eine Weiterentwicklung des Polymer-Beschichtungsverfahrens besteht in der Modifizierung der Freisetzungskinetik von Wirksubstanzen. Aus der eigenen Arbeitsgruppe gelang es Strobel et al. durch eine veränderte Zusammensetzung aus Polymerbeschichtung, Lösungsmittel und Wirkstoff verschiedene Freisetzungskinetiken der Wirkstoffe zu bewirken: Sie unterschieden zunächst eine stoßartige Freisetzung von hohen Wirkstoffkonzentrationen von einer langsamen und kontinuierlichen Freisetzung über einen Zeitraum von mehreren Wochen (Strobel 2011A). Dies kann in zukünftigen Studienreihen dazu genutzt werden, einen optimalen Wirkzeitpunkt für heilungsstimulierende Substanzen zu finden um den natürlichen Verlauf der Knochenheilung besser zu unterstützen. Manche Untersuchungen weisen beispielsweise daraufhin, dass eine spätere BMP-Applikation einen besseren Effekt auf die Heilung habe (Betz 2007, Seeherman 2006). Ebenfalls wurde von Strobel et al. eine Kombination aus Antibiotikum und Wachstumsfaktor erfolgreich entwickelt (Strobel 2011B). Sie konnten dabei mit dem Beschichtungsverfahren unterschiedliche Freisetzungprofile für die verschiedenen

Wirksubstanzen erreichen. Ebenfalls wäre die Kombination unterschiedlicher Wachstumsfaktoren eine denkbare Weiterentwicklung in den Behandlungsoptionen.

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte die Beschichtung von intramedullären Drähten mit Wachstumsfaktoren bereits erfolgreich durchgeführt werden (Schmidmaier 2001). Eine Übertragung des Prinzips auf andere Osteosynthesematerialien könnte beispielsweise in der Wirbelsäulen Chirurgie in Form von Fusioncages die Ortsständigkeit des Wachstumsfaktors gewährleisten (Kandziora 2002). Des Weiteren könnten resorbierbare Osteosynthesen beschichtet werden und somit ein weiteres Forschungsfeld eröffnen. Resorbierbare Materialien bieten gegenüber anderen Osteosynthesen den Vorteil, dass sie sich im Knochen auflösen und keine Implantatentfernung vorgenommen werden muss.

Insgesamt hat sich das vorliegende Tiermodell als zuverlässig erwiesen, um eine beeinflusste Knochenheilung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Heilung des osteotomierten Knochens mittels des BMP-beschichteten Drahts effektiv verbessert werden. Das Modell eignet sich demnach auch für die Testung weiterer heilungsfördernder Wirksubstanzen. Zukünftig sollte weiterhin erforscht werden, zu welchen Zeitpunkten eine Applikation von BMP-2 die Knochenheilung am besten stimulieren kann.

V ZUSAMMENFASSUNG

Im traumatologisch-orthopädischen Alltag stellen Knochenheilungsstörungen eine schwere Komplikation dar. Diese erfordern langwierige Therapien und stellen eine schwere Belastung für die betroffenen Patienten dar. Erkenntnisse um die Wichtigkeit des Periosts und des Knochenmarks haben zur Erforschung neuer Osteosynthesen und weichteilschonender Operationsmethoden geführt. Dennoch können damit nicht alle Knochendefekte zur Heilung gebracht werden. Sofern eine ausreichende Stabilität vorhanden ist und eine Infektion ausgeschlossen werden kann, rückt die fehlende biologische Stimulation als ursächliche Erklärung in den Vordergrund.

Zur Stimulation der Knochenheilung werden bislang zwei Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der Bone morphogenetic proteins (BMPs) erfolgreich in der Klinik eingesetzt: BMP-2 und BMP-7. BMP-2 ist als Diboterminal- α zugelassen für die Behandlung von offenen Tibiaschaftfrakturen und in der Wirbelsäulen Chirurgie. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass BMP die Knochenheilung durch Stimulation der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen anregt. Bislang wird rhBMP-2 lokal mittels eines Kollagenschwamms appliziert. Dabei muss allerdings die Frakturstelle bzw. der Knochendefekt eröffnet werden, um das Material einzubringen. Eine Weiterentwicklung in der Behandlung mit Wachstumsfaktoren ist die Beschichtung geeigneter Osteosynthesematerialien, sodass eine Kombination aus mechanischer Stabilität und gleichzeitig Freisetzung der Wirksubstanz erreicht werden kann. Daran anknüpfend war die Zielstellung dieser Dissertation, den Einfluss von lokal appliziertem BMP-2 auf ein verzögert heilendes Osteotomie-Modell der Ratte zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde ein mit BMP-2 (50 μ g) beschichteter Kirschner-Draht in einem Osteotomie-Modell an der Ratte angewandt. Im Vorversuch durch Kratzel et al. zeigte sich, dass eine Osteotomie der Rattentibia in einer verzögerten Knochenheilung resultierte. Als Trägermaterial für den applizierten Wachstumsfaktor wurde das Polymer PDLLA zur Beschichtung der Kirschner-Drähte ausgewählt. Das Studiendesign umfasste 48 Tiere, Tötungen fanden zur Untersuchung der frühen Knochenheilung (fünf und zehn Tage) und der späteren Heilungsphasen (28, 42 und 84 Tage) statt. Es erfolgten radiologische, biomechanische sowie histomorphologische und histomorphometrische Untersuchungen. Des Weiteren wurde eine

immunhistochemische Färbung zur Erfassung der Angiogenese der frühen Heilungsphase angewandt. Als Kontrollgruppe dienten die zur Etablierung des Osteotomie-Modells von Kratzel et al. operierten Tiere.

Die biomechanische Testung zeigte sowohl für die torsionale Steifigkeit als auch für das maximale Drehmoment signifikant bessere Ergebnisse in der BMP-Gruppe. Somit konnte eine höhere Stabilität des Kallus unter BMP-Einfluss belegt werden. Die radiologische Auswertung mittels Röntgenscore ergab eine weiter fortgeschrittene Knochenheilung mit teilweise vollständiger Konsolidierung des Osteotomiedefekts in der BMP-Gruppe während es in der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum von 84 Tage nicht zu einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts kam. Die histologische Aufarbeitung mit Anwendung verschiedener Färbemethoden ließ die Beurteilung verschiedener Kallusqualitäten zu, welche dann histomorphometrisch erfasst wurden. In der Kontrollgruppe fiel in der frühen Heilungsphase (zehn Tage) eine signifikant größere Kallusfläche mit gesteigerter Gefäßdichte auf. Diese überschießende Reaktion konnte mit der Applikation von BMP verhindert werden. Es zeigte sich zudem in der BMP-Gruppe ein erhöhter Knorpelanteil im frühen periostalen Kallus. Des Weiteren war der mineralisierte Anteil am Kallus nach 42 Tagen signifikant erhöht.

Die Ergebnisse im zeitlichen Verlauf führen zu der Schlussfolgerung, dass die lokale BMP-2 Applikation von beschichteten Kirschner-Draht ein verzögert heilendes Osteotomie-Modell der Ratte zur Heilung bringen kann. Dabei scheint die Wirksubstanz zum einen eine frühe überschießende inflammatorische Phase zu verhindern und zum anderen die Knochenheilung zu beschleunigen.

Das angewandte Osteotomie-Modell erwies sich als zuverlässig, um eine beeinträchtigte Knochenheilung zu produzieren. Anhand dieses Modells kann auch eine Weiterentwicklung der Polymer-Beschichtung untersucht werden. Eine Modulation der Freisetzungskinetik sowie die Kombination mit anderen Wirksubstanzen oder auch die Übertragung des Prinzips auf andere Osteosynthesematerialien stellen Ansatzpunkte für weitere Studien dar.

Insgesamt erwies sich das Beschichtungsverfahren mit PDLLA in der vorliegenden Dissertation als effektive Applikationsform für BMP-2. Der applizierte Wachstumsfaktor konnte den Verlauf einer beeinträchtigten Knochenheilung positiv beeinflussen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury* 2007;38(10):1115-30.
- Augustin G, Davila S, Mihoci K, Udiljak T, Vedrina DS, Antabak A. Thermal osteonecrosis and bone drilling parameters revisited. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128(1):71-7.
- Benglis D, Wang MY, Levi AD. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 2008;62(5 Suppl 2):423-31.
- Bergmann A, Schwarz B, Mittelmeier H. [Cause, prognosis and therapy of tibial pseudarthroses]. *Aktuelle Traumatol* 1989;19: 205–8.
- Betz OB, Betz VM, Nazarian A, et al. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther* 2007;14(13):1039-44.
- Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 2007;31(6):721-7.
- Bostrom MP, Camacho NP. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):S274-82.
- Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 1995; 13:357–67.
- Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(8):1219-30.
- Bramlage CP, Häupl T, Kaps C et al. Bone morphogenetic proteins in the skeletal system. *Z Rheumatol* 2005;64(6):416-22.
- Cannon JE, Upton PD, Smith JC, Morrell NW. Intersegmental vessel formation in zebrafish: requirement for VEGF but not BMP signalling revealed by selective and non-selective BMP antagonists. *Br J Pharmacol.* 2010;161(1):140-9.

- Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*. 2003;8(21):980-9.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004;22(4):233-41.
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(8):1544-52.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17:513–20.
- Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P. Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 2006;24(6):1178-85.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(3):133-43.
- Cole C, Seto C, Gazewood J. Plantar fasciitis: evidence-based review of diagnosis and therapy. *Am Fam Physician* 2005;72(11):2237-42.
- Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg* 2000;43(4):256-62.
- Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: a review. *Injury* 2006;37:691-7.
- Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res* 2005;65(18):8274-8285.
- David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(3):203-12.
- De Biase P, Capanna R. Clinical applications of BMPs. *Injury* 2005; 36(3):43–6.

- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002;143(4):1545-53.
- DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):859-74.
- DeLustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. *Clin Orthop* 1990;260:263–279.
- Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov* 2008;92(3):161-8.
- Dimitriou R, Carr IM, West RM, Markham AF, Giannoudis PV. Genetic predisposition to fracture non-union: a case control study of a preliminary single nucleotide polymorphisms analysis of the BMP pathway. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:44.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36(12):1392-404.
- Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(8):1425-35.
- Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(367 Suppl):59-67.
- Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(6):940-56.
- Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):7-21.
- Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
- Emes Y, Aybar B, Vural P, et al. Effects of bone morphogenetic proteins on osteoblast cells: vascular endothelial growth factor, calcium, inorganic phosphate, and nitric oxide levels. *Implant Dent.* 2010;19(5):419-27.

- Engstrand T, Veltheim R, Arnander C, et al. A novel biodegradable delivery system for bone morphogenetic protein-2. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(6):1920-8.
- Epstein NE. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery. *Surg Neurol Int* 2011;2:10.
- Eriksson AR, Albrektsson T, Albrektsson B. Heat caused by drilling cortical bone. Temperature measured in vivo in patients and animals. *Acta Orthop Scand* 1984;55(6):629-31.
- Filbin MT. How inflammation promotes regeneration. *Nat Neurosci* 2006;9(6):715-7.
- Friedlaender GE. Osteogenic protein-1 in treatment of tibial nonunions: current status. *Surg Technol Int* 2004;13:249-52.
- Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Raschke MJ. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011;131(10):1419-25.
- Garcia P, Herwerth S, Matthys R, et al. The LockingMouseNail-a new implant for standardized stable osteosynthesis in mice. *J Surg Res* 2011;169(2):220-6.
- Garrison KR, Shemilt I, Donell S, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jun 16;(6):CD006950.
- Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 2007;77(8):626-31.
- Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol* 2010;17(3):245-51.
- Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003;18(9):1584-92.
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a postnatal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88:873-84.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36(3):S20-7.

- Govender S, Csimma C, Genant HK et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(12):2123-34.
- Greiner SH, Wildemann B, Back DA et al. 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.
- Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2009;31(12):1825-35.
- Hao Y, Ma Y, Wang X, Jin F, Ge S. Short-term muscle atrophy caused by botulinum toxin-A local injection impairs fracture healing in the rat femur. *J Orthop Res* 2012;30(4):574-80.
- Harrison LJ, Cunningham JL, Stromberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 2003;17: 11–21.
- Heckman JD, Sarasohn-Kahn J. The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Diss* 1997;56(1):63-72.
- Henrotin Y. Muscle: a source of progenitor cells for bone fracture healing. *BMC Med* 2011;9:136.
- Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. *Injury* 1995;26(10):681-6.
- Histing T, Garcia P, Holstein JH, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011;49(4):591-9.
- Jacobs CR, Temiyasathit S, Castillo AB. Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:369-400.
- Kandziora F, Bail H, Schmidmaier G, et al. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 2002;97(1 Suppl):40-8.

- Kaspar K, Matziolis G, Strube P, et al. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res* 2008;26(12):1649-55.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172(1):295-9.
- Klein P, Schell H, Streitparth F, et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 2003;21(4):662-9.
- Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(4):427-34.
- Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003;21(3):503-10.
- Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16(6):1004-14.
- 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;9:135.
- 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.
- Lind M, Eriksen EF, Bünger C. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* 1996;18(1):53-7.
- 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):1271-80.
- Little DG, McDonald M, Bransford R, Godfrey CB, Amanat N. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model. *J Bone Miner Res* 2005;20(11):2044-52.

- Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, et al. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* 2001;68(1):92-102.
- Makino T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2005;23(3):632-8.
- Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 2005;36(3):13-9.
- Markel MD, Bogdanske JJ, Xiang Z, Klohn A. Atrophic nonunion can be predicted with dual energy x-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *J Orthop Res* 1995;13(6):869-75.
- Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat.* 1988;183(1):1-44.
- Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 2009;40 Suppl 3:S4-7.
- Matthews LS, Hirsch C. Temperatures measured in human cortical bone when drilling. *J Bone Joint Surg Am* 1972;54(2):297-308.
- McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978;60-B(2):150-62.
- Meisinger C, Wildner M, Stieber J, Heier M, Sangha O, Döring A. [Epidemiology of limb fractures]. *Orthopäde* 2002;31(1):92-9.
- Melcher GA, Metzdorf A, Schlegel U, Ziegler WJ, Perren SM, Printzen G. Influence of reaming versus nonreaming in intramedullary nailing on local infection rate: experimental investigation in rabbits. *J Trauma* 1995;39(6):1123-8.
- Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc* 1989;3(3):953-60.
- Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg* 1990;72(5):822-9.

- Moreno-Miralles I, Schisler JC, Patterson C. New insights into bone morphogenetic protein signaling: focus on angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2009;16(3):195-201.
- Nakase T, Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab* 2006;24: 425–33.
- Otsuka F. Multiple endocrine regulation by bone morphogenetic protein system. *Endocr J* 2010;57(1):3-14.
- Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000;5(1):64-70.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595-610.
- Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma* 1999;13(2):114-20.
- Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone* 2009;45(3):505-11.
- Petite H, Viateau V, Bensaïd W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18(9):959-63.
- Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 2005;36 Suppl 3:5-7.
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006;444(120):761-765.
- Poynton AR, Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* 2002;27(16S): 40-48.
- Probst A, Jansen H, Ladas A, Spiegel HU. Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats. *J Orthop Res* 1999;17(2):256-60.

- Raida M, Clement JH, Ameri K, Han C, Leek RD, Harris AL. Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *Int J Oncol* 2005;26(6):1465-70.
- Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355S:66–72.
- Rennenberg RJ, Schurgers LJ, Kroon AA, Stehouwer CD. Arterial calcifications. *J Cell Mol Med* 2010;14(9):2203-10.
- Rommens PM, Broos PL. The significance of soft tissue trauma for fracture healing. A prospective study on 70 tibial shaft fractures following primary treatment with the Monofixateur. *Unfallchirurg* 1992;95(3):133-41.
- Rosen V. BMP-2 signaling in bone development and repair. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20: 475-80.
- Runkel M, Rommens PM. Pseudarthrose. *Unfallchirurg* 2000;103(1):51-63.
- Rüter A, Mayr E. [Pseudarthrosis] *Chirurg* 1999;70(11):1239-45.
- Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009;30:2479–88
- Schenk RK, Perren SM. [Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis]. *Hefte Unfallheilkd* 1977;(129):29-41.
- Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 2006;37 Suppl 2:105-12.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001;28(4):341-50.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg, Raschke M. Die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF-beta1 aus einer biodegradierbaren Poly(D.L-Lactid) Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung. *Der Chirurg* 2000;71:1016-22.

- Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, et al. Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *Eur J Trauma* 2004;30:35–42.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, et al. Biodegradable poly(D,Llactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 2001;58(4):449-55.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandizora F, Haas NP, Raschke M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodelling in fracture treatment: A biomechanical and histological study in rats. *Bone* 2002;30(6):816-22.
- Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res* 2012;347(3):567-73.
- Schöffl V, Hochholzer T, Schöffl I. Extensor hood syndrome—osteophytic irritation of digital extensor tendons in rock climbers. *Wilderness Environ Med* 2010;21(3):253-6.
- Schweiberer L, Baumgart R, Deiler S. The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance. *Chirurg* 1999;70(11):1193-201.
- Seeherman H, Li R, Bouxsein M, et al. rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88: 144–60.
- Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):329-45.
- Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006;354(21):2250-61.
- Senta H, Park H, Bergeron E, et al. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(3):213-22.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191-7.
- Simmons DJ. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;(200):100-13.

- Soda H, Raymond E, Sharma S et al. Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs*. 1998;9(4):327-31.
- Steinert AF, Proffen B, Kunz M, et al. Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):148.
- Strobel C, Bormann N, Kadow-Romacker A, Schmidmaier G, Wildemann B. Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants. *J Control Release*. 2011;156(1):37-45. B
- Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer. *Int J Artif Organs*. 2011;34(3):304-16. A
- Suwa F, Fang YR, Toda I, et al. SEM study on microvascular changes following implantation of bone morphogenetic protein combined with hydroxyapatite into experimental bone defects. *J Osaka Dent Univ*. 1998;32(1):27-34.
- Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, Watabe T, Miyazono K. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem*. 2008;143(2):199-206.
- Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174(1):96-101
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(6):1367-78.
- Thawani JP, Wang AC, Than KD, Lin CY, La Marca F, Park P. Bone Morphogenetic Proteins and Cancer: Review of the Literature. *Neurosurgery* 2010;66(2):233-46.
- Thorey F, Menzel H, Lorenz C, Gross G, Hoffmann A, Windhagen H. Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated

- titanium implants in femora of New Zealand white rabbits. *Indian J Orthop.* 2011;45(1):57-62.
- Tölli H, Kujala S, Jämsä T, Jalovaara P. Reindeer bone extract can heal the critical-size rat femur defect. *Int Orthop.* 2011;35(4):615-22.
- Trostle SS, Markel MD. Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12(1):19-46.
- Turgeman G, Zilberman Y, Zhou S, et al. Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem.* 2002;86(3):461-74.
- Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury.* 2007;38(2):3-9.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-9.
- Valdes MA, Thakur NA, Namdari S, Ciombor DM, Palumbo M. Recombinant bone morphogenetic protein-2 in orthopaedic surgery: a review. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129(12):1651-7.
- Varkey M, Gittens SA, Uludag H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004;1(1):19-36.
- Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, Stöckle U, Lucke M. Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants: In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury.* 2010;41(10):1053-9.
- Weber BG, Cech O. Pseudoarthrosis: Pathology, Biomechanics, Therapy, Results. Berne, Switzerland; Hans Huber Medical Publisher;1976.
- Wei S, Cai X, Huang J, Xu F, Liu X, Wang Q. Recombinant human BMP-2 for the treatment of open tibial fractures. *Orthopedics.* 2012;35(6):e847-54.
- Wildemann B, Bamdad P, Holmer Ch, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 2004;34(5):862-8.
- Wildemann B, Sander A, Schwabe P, et al. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)-growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterial* 2005;26:4035-40.

- Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 1990;252:276-93.
- Wong DA, Kumar A, Jatana S, Ghiselli G, Wong K. Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal: a potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Spine J.* 2008;8(6):1011-8.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988;242(4885):1528-34.
- Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27(16S):2-8.
- Ylä-Herttua S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(10):1015-26.
- Yu YY, Lieu S, Lu C, Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* 2010;47(1):65-73. A
- Yu YY, Lieu S, Lu C, Micalau T, Marcucio RS, Colnot C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone* 2010;46(3):841-51. B
- Zapf J, Froesch ER. Pathophysiological and clinical aspects of the insulin-like growth factors. *Horm Res.* 1986;24(2-3):160-5.
- Zhang F, Qiu T, Wu X, et al. Sustained BMP signaling in osteoblasts stimulates bone formation by promoting angiogenesis and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2009;24(7):1224-33.
- Zioncheck TF, Chen SA, Richardson L, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human transforming growth factor beta 1 after topical and intravenous administration in male rats. *Pharm Res.* 1994;11(2):213-20.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
α SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
d	Tag
Dtl.	Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
FGF	Fibroblast Growth Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF	Insulin-like growth factors
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
MAPK	mitogen-activated protein Kinase
MEA	Monoethanolamin
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROI	Region of Interest
SOC	Standard of Care
Tab	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Weitere Abkürzungen werden im Kapitel Material und Methoden eingeführt und erklärt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Remodelling Zyklus eines Knochen trabekels. Bei einer Verletzung des Knochens (Microcrack) setzen Lining Cells und Osteozyten lokale Faktoren frei, die Zellen aus dem Blut und Knochenmark anlocken. Diese entwickeln sich zu Osteozyten und formen eine Resorptionshöhle. Osteoblasten füllen diese Höhle mit neuem Knochen wieder auf. In Knochenmatrix eingeschlossene Osteoblasten werden zu Osteozyten oder sterben ab (modifiziert nach Seeman et al. 2006).

Abb. 2: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Cech 1976.

A1 Hypertrophe kallusreiche Pseudarthrose (Elefantenfuß). A2 Kallusarme Pseudarthrose (Pferdefuß). A3 Oligotrophe, kalluslose Pseudarthrose. B1 Avitale Drehkeilpseudarthrose. B2 Defektpseudarthrose. B3 Atrophe Pseudarthrose

Abb. 3: BMPs und die Induktion der Osteoblastendifferenzierung (Cheng et al. 2003)

Abb. 4: Darstellung der Rolle von BMPs in der Knochenheilung. Eine typische Abfolge von Ereignissen kann bei der durch BMPs induzierten enchondralen Ossifikation beobachtet werden: Rekrutierung und Proliferation von Monozyten und mesenchymalen Zellen, Differenzierung in Chondrozyten, Kalzifikation der Knorpelmatrix, vaskuläre Invasion, Differenzierung von Osteoblasten und Remodelling des neugeformten Knochens (Termaat et al. 2005)

Abb. 5: Intraoperative Darstellung der Osteotomie; **(a):** Stabilisation mit dem BMP-2 beschichteten Titan-Kirschner-Drahtes; **(b):** Kontrolle während der OP zur Kontrolle des Drahtposition intramedullär

Abb. 6: Konventionelle Röntgenaufnahmen im Verlauf. Exemplarische Darstellung der Röntgenaufnahme eines Tieres der BMP-Gruppe nach 42 Tagen; **(a):** im posterior-anterioren Strahlengang; **(b):** im lateralen Strahlengang

Abb. 7: Einbetten der Tibia: **(a):** Zunächst wird die Tibia mit Technovit 3040 von distal in ein Förmchen eingebettet. **(b):** Dann erfolgt das Einbetten des proximalen Knochenendes. **(c):** Anschließend wurden die Tibiae für die torsionale Testung in die Zwick eingespannt.

Abb. 8: Schematische Darstellung der Torionstestmaschine (Zwick). Der in Formen (1) eingebettete Knochen wird in der Testmaschine fixiert. Mit einer Vorlast von 1N (5) wird der Knochen vorbelastet. Die Prüfmaschine (2) erzeugt eine lineare Bewegung, die über den Hebelarm (3) in eine Drehbewegung umgewandelt wird. Das erzeugte Torsionsmoment wird durch eine Kraftmessdose (4) gemessen.

Abb. 9: Exemplarischer Verlauf der Belastungs-Deformitätskurve. Ausgleichsgerade grün zur Ermittlung der Steifigkeit, der Kreis markiert das maximale Drehmoment

Abb. 10: Übersicht der angewandten Färbungen an Tag 5 und 10 (Vergleichsgruppe, 10 d). **(a):** HE-Übersichtsfärbung, Beurteilung der Kallusgröße, der entzündlichen Reaktion und der Zellzusammensetzung; **(b):** Alcianblau-/Kernechtrotfärbung, Beobachtung der Knorpelausdehnung anhand des blau angefärbten Knorpels; **(c):** Movat Pentachrom-Färbung, Beurteilung der trabekulären Kallusbildung. Knöchernen Strukturen stellen sich gelb dar, Knorpel ist grün angefärbt.

Abb. 11: Färbung nach von Kossa (BMP-Gruppe, 84d). Beispielhaftes Schnittpräparat (BMP-Gruppe, 84 d); Beurteilung von Knochen (schwarz) und Weichteilgewebe (hellrot)

Abb. 12: Methylgrün/ van Gieson Färbung (BMP-Gruppe, 42d). Beispielhaftes Schnittpräparat (BMP-Gruppe, 42 d); Beurteilung von Knochen (rot) und Knorpel (grün)

Abb. 13: α SMA-Färbung. Gefäße werden durch rote Anfärbung dargestellt.

Abb. 14: Region of Interest (ROI). Beispielhafte Darstellung zur Ermittlung der ROI am histologischen Schnittpräparat einer Rattentibia

Abb. 15: Graphische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere

Abb. 16: Exemplarische Darstellung der Röntgenaufnahmen im zeitlichen Verlauf. **(a-d):** Kontrollgruppe. Im gesamten Verlauf ist keine knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalts zu erkennen. Nach 84 Tagen (d) ist eine Pseudarthrose entstanden. Es fällt eine progressive Zunahme der Knochendicke an den Osteotomierändern auf. **(e-h):** BMP-2-Gruppe. Nach 28 Tagen (f) ist ein röntgendichter Kallus um den Osteotomiespalt herum entstanden. Der Knochenspalt ist bereits einseitig knöchern

überbrückt. Nach 42 Tagen (g) hat sich der Kallus reduziert. Nach 84 Tagen (h) ist die Tibia komplett verheilt.

Abb. 17: Graphische Darstellung der Ergebnisse der radiologischen Kontrollen; Einteilung der Heilungsstadien gemäß des Röntgenscores.

Abb. 18: Exostosen in der makroskopischen Ansicht und im radiologischen Korrelat. **(a):** Pathologisch veränderte Tibia neben dem gesunden kontralateralen Knochen. **(b):** Die Exostose auf der Tuberositas Tibia ist blau umrandet und vergrößert dargestellt. **(c):** Auf dem Röntgenbild der lateralen Ebene ist die Exostose als zystisch aufgetriebene, röntgendichte und klar abgegrenzte Wucherung zu sehen.

Abb. 19: Maximales Drehmoment [%] zur gesunden Seite

Abb. 20: Torsionale Steifigkeit [%] zur gesunden Seite

Abb. 21: Sagittale histologische Schnitte der Färbung Hämatoxylin-Eosin im Gruppenvergleich. Exemplarische Gewebsschnitte (a) der Kontrollgruppe und (b) der BMP-Gruppe 10 d nach der Osteotomie

Abb. 22: Früher Kallus; Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, Movat-Pentachrom-Färbung, 5x Vergrößerung. Dargestellt ist der Osteotomiespalt (OS) mit umliegendem Weichteilkallus. Der Kallus besteht vorwiegend aus Knorpelgewebe (KG). An den Kortizes (KO) hat sich Geflechtknochen angelagert. Dieser besteht aus Geflechtknochen trabekeln (GKNT) und Lakunen (L).

Abb. 23: Knorpelgewebe. Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, Alcianblau-/Kernechtrot-Färbung, 20x Vergrößerung. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer Knorpelinsel, die neben der Osteotomie lokalisiert ist. Der hyaline Knorpel ist auf der rechten Seite des Bildes intensiv blau gefärbt. Auf der linken Bildhälfte beginnt die Knorpelmatrix zu verknöchern, erkennbar an der hell-rosa Färbung. Die Chondrozyten sind blasenartig aufgetrieben und gehen zugrunde. Teilweise sind nur noch Zellreste zu erkennen.

Abb. 24: Osteotomiespalt. Exemplarisches histologisches Schnittpräparat der BMP-Gruppe 10 d post Osteotomie, HE-Färbung, 20x Vergrößerung. Dargestellt ist eine

vergrößerte Ansicht auf den Osteotomiespalt (OS). An die Kortikalis (Ko) hat sich Knorpelgewebe (KG) angelagert. Neben dem Osteotomiespalt sind zwei Knochensplitter (KS) zu erkennen. In unmittelbarer Umgebung liegt eine Ansammlung von Zelltrümmern, Detritus (D). Des Weiteren sind eine Howship'sche-Lakune mit einem Osteoklast (OK) und mehreren Osteoblasten (OB) in der Vergrößerung zu sehen.

Abb. 25: Exemplarische sagittale histologische Schnittpräparate im Gruppenvergleich nach 28, 42 und 84 Tagen; Übersichtsaufnahmen, gefärbt nach von Kossa

Abb. 26: Gewebezusammensetzung im Kallus 28 Tage nach der Osteotomie. Exemplarisches histologisches Schnittpräparat eines Kallus der BMP-2 Gruppe 28 Tage postoperativ; Ausschnittsvergrößerung 10x, gefärbt nach von Kossa. BG: Bindegewebe, OS: Osteotomiespalt, GKNT: Geflechtknochentrabekel, KO: Kortikalis, KPG: Knorpelgewebe, LKN: Lamellärer Knochen

Abb. 27: Exemplarische sagittale Schnittpräparate gefärbt mit Methylgrün-/van Gieson im Gruppenvergleich nach 28, 42 und 84 Tagen. Exemplarische Darstellung der gefärbten Gewebsschnitte der Kontrollgruppe (a-c;g-i) und der BMP-Gruppe (d-f;j-l) zu den Zeitpunkten 28 d; 42 d und 84 d; bei 5-facher Vergrößerung (a-f) und bei 20-facher Vergrößerung (g-l)

Abb. 28: Darstellung der Knorpelmorphologie nach 42 Tagen. Exemplarisches sagittales Schnittpräparat eines Kallus aus der BMP-2-Gruppe nach 42 Tagen. Färbung: Methylgrün/ van Giesson. BG: Bindegewebe; KPG: Knorpelgewebe; jCH: junger Chondrozyt; hCH: hypertropher Chondrozyt; aCH: apoptotischer Chondrozyt; ITS: Interterritorialsubstanz; GKN: Geflechtknochen; L: Lankune; OZ: Osteozyt.

Abb. 29: Graphische Darstellung der Kallusgröße an Tag 5 und Tag 10 im Gruppenvergleich

Abb. 30: Graphische Darstellung des Knorpelanteils am Gesamtkallus (%)

Abb. 31: Graphische Darstellung der Vaskularisierung des Kallus (Gefäße/mm²)

Abb. 32: Mineralisierter Anteil am Gesamtkallus (%)

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung (modifiziert nach Dimitriou 2005)
- Tab. 2:** Versuchsaufbau der Kontrollgruppe und der BMP-Gruppe
- Tab. 3:** Einteilung des Heilungsstadiums nach dem Röntgenscore
- Tab. 4:** Färbeprotokolle nach von Kossa und Methylgrün / van Gieson
- Tab. 5:** Färbeprotokolle: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Alcianblau-/Kernechtrot Färbung, Movatpentachrom-Färbung
- Tab. 6:** Abkürzungsverzeichnis nach Parfitt
- Tab. 7:** Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung
- Tab. 8:** Ergebnisse der Zwick-Testung der gesunden Tibia
- Tab. 9:** Darstellung des Tibiadurchmessers (TiDm) [mm]
- Tab. 10:** Darstellung des mineralisierten Anteils an der Kortikalis (CtMdBAr/CtAr) [%]
- Tab. 11:** Darstellung des periostalen Kallus (PsCaAr/TiDm) [mm]
- Tab. 12:** Darstellung des Knorpelanteils am periostalen Kallus (CgAr/PsCaAr) [%]

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Katharina Lange, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluss von BMP-2 beschichteten Kirschner-Drähten - Eine Studie im Osteotomie-Modell der Ratte - selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Katharina Lange hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: 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.

Kongressbeitrag 1: Wildemann B, Lange K, Strobel C, Schmidmaier G. A New Impaired Healing Rat Model to Test the Efficacy of Stimulating Factors. ORS 2010, New Orleans.

Kongressbeitrag 2: Wildemann B., Lange K., Strobel C., Fassbender M., Schmidmaier G. Stimulation der verzögerten Osteotomieheilung durch lokale BMP-2 Applikation. Osteologie 2010, Berlin.

Beitrag im Einzelnen:

Kontribution der im Rahmen der Dissertation erhobenen Daten und Ergebnisse.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Prof. Dr. Britt Wildemann möchte ich für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas, ihr Vertrauen in mich und die hervorragende Betreuung meinen großen Dank aussprechen. Sie hat meine Arbeit fortlaufend intensiv begleitet und stand mir zur Beantwortung aller Fragen stets kompetent zur Seite. Mit Kritik und Anregungen konnte sie mich motivieren, die Fertigstellung meiner Dissertation voranzutreiben. Ohne die Unterstützung von Prof. Dr. Britt Wildemann wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die engagierte Betreuung bei den klinischen Belangen dieser Studie danke ich Dr. Christine Kratzel. Zum einen beeindruckte mich ihr professioneller respektvoller Umgang mit den Versuchstieren, zum anderen lernte ich von ihr, die erhobenen Daten und Ergebnisse stets auch kritisch zu hinterfragen.

Eine große Stütze während der gesamten Arbeit war meine Mitstreiterin Camilla Bergmann. Mithilfe ihrer tatkräftigen Unterstützung während der histologischen Untersuchungen und auch durch gemeinsam für die Wissenschaft geopfert Abende und Wochenenden in der Bildanalyse konnte diese Arbeit entstehen.

Beim Histologielaor-Team des Julius Wolff Instituts möchte ich mich ganz herzlich für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Marzena Princ und Zeinab Kronbach. Dr. Catrin Strobel führte freundlicherweise die Beschichtung der Drähte mit dem Wachstumsfaktor durch. Für die freundliche Unterstützung bei der Beantwortung von vielen, vielen Fragen zur Bildanalyse möchte ich Herrn Martin Thiele danken. Auch Dipl.-Ing. Alexander Schill vom Biomechaniklabor gilt Dank für freundliche Anleitung zur Bedienung der Zwick.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank für ihr uneingeschränktes Vertrauen in mich, denn sie haben mir das Studium der Humanmedizin und somit auch diese Promotion ermöglicht. Mein herzlicher Dank richtet sich an Christian Palmer, seine Unterstützung hat einen wesentlichen Anteil an dem erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation.

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

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.

Wildemann B, **Lange K**, Strobel C, Schmidmaier G. A New Impaired Healing Rat Model to Test the Efficacy of Stimulating Factors. ORS 2010, New Orleans.

Wildemann B., **Lange K.**, Strobel C., Fassbender M., Schmidmaier G. Stimulation der verzögerten Osteotomieheilung durch lokale BMP-2 Applikation. *Osteologie* 2010, Berlin.