

Aus dem Julius Wolff Institut und Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Fremdkörperreaktion nach Stimulation der Frakturheilung durch die Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- $\beta$ 1**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Andre Sander  
aus Nordhorn

Gutachter:       1. Prof. Dr. rer. nat. B. Wildemann  
                      2. Priv.-Doz. Dr. med. T. Kälicke  
                      3. Prof. Dr. med. C. Schinkel

Datum der Promotion: 19.11.2010

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	BIOMATERIALIEN .....	2
1.2	BIOKOMPATIBILITÄT VON BIOMATERIALIEN .....	3
1.3	WECHSELWIRKUNGEN VON GEWEBEN UND IMPLANTATEN .....	5
1.4	AKUTE PHASE REAKTION .....	6
1.5	CHRONISCHE ENTZÜNDUNGSREAKTION UND FREMDKÖRPERREAKTION (FBR).....	9
1.6	DIE ROLLE VON MAKROPHAGEN .....	10
1.7	DIE ROLLE VON OSTEOKLASTEN .....	12
1.8	BIODEGRADIERBARE POLYMERE .....	13
1.9	BIOKOMPATIBILITÄT VON DEGRADIERBAREN POLYMEREN .....	15
1.10	APPLIKATION VON WIRKSUBSTANZEN .....	16
1.11	POLYMERE ALS DRUG DELIVERY SYSTEMS (DDS) .....	17
1.12	FREISETZUNG VON BIOAKTIVEN SUBSTANZEN AUS EINER POLYMERBESCHICHTUNG .....	18
1.13	WACHSTUMSFAKTOREN (WF).....	19
1.14	WIRKUNGSWEISE UND WIRKUNG VON WACHSTUMSFAKTOREN (WF) .....	19
1.15	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I) .....	21
1.16	TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).....	21
1.17	KOMBINATION VON IGF-I UND TGF- $\beta$ 1 .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
2.1	VERSUCHSTIERE .....	24
2.2	FRAKTURMODELL UND FRAKTURMASCHINE .....	24
2.3	OPERATIVES VORGEHEN .....	25
2.3.1	<i>Material</i> .....	25
2.3.2	<i>Geräte</i> .....	27
2.3.3	<i>Narkose und Operation</i> .....	27
2.4	GRUPPENEINTEILUNG .....	28
2.5	UNTERSUCHUNGEN .....	28
2.5.1	<i>Material</i> .....	28
2.5.2	<i>Geräte</i> .....	28
2.5.3	<i>Durchführung</i> .....	29
2.6	TÖTUNGEN UND IMPLANTATENTFERNUNG .....	29
2.6.1	<i>Material</i> .....	29
2.6.2	<i>Geräte</i> .....	29
2.6.3	<i>Durchführung</i> .....	30
2.7	FIXIERUNG, DEKALZIFIZIERUNG, EINBETTUNG UND PARAFFINSCHNITTE .....	30
2.7.1	<i>Material</i> .....	30
2.7.2	<i>Geräte</i> .....	30

2.7.3	<i>Durchführung</i> .....	30
2.8	HISTOLOGIE.....	31
2.8.1	<i>Material</i> .....	31
2.9	IMMUNHISTOLOGIE.....	32
2.9.1	<i>Material</i> .....	32
2.9.2	<i>Geräte</i> .....	33
2.9.3	<i>Durchführung</i> .....	33
2.10	TRAP.....	35
2.10.1	<i>Material</i> .....	35
2.10.2	<i>Geräte</i> .....	36
2.10.3	<i>Durchführung</i> .....	36
2.11	AUSWERTUNG.....	37
2.11.1	<i>Geräte</i> .....	37
2.11.2	<i>Statistik</i> .....	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
3.1	KLINISCHER VERLAUF UND LABORPARAMETER.....	39
3.2	ERGEBNISSE IM VERLAUF (HISTOLOGIE, IMMUNHISTOLOGIE, TRAP).....	39
3.2.1	<i>5 Tage nach Operation</i> .....	39
3.2.1.1	<i>Histologie</i> :.....	39
3.2.1.2	<i>Immunhistologie</i> :.....	40
3.2.1.3	<i>TRAP</i> :.....	43
3.2.2	<i>10 Tage nach Operation</i> .....	45
3.2.2.1	<i>Histologie</i> :.....	45
3.2.2.2	<i>Immunhistologie</i> :.....	46
3.2.2.3	<i>TRAP</i> :.....	47
3.2.3	<i>15 Tage nach Operation</i> .....	49
3.2.3.1	<i>Histologie</i> :.....	49
3.2.3.2	<i>Immunhistologie</i> :.....	50
3.2.3.3	<i>TRAP</i> :.....	52
3.2.4	<i>28 Tage nach Operation</i> .....	55
3.2.4.1	<i>Histologie</i> :.....	55
3.2.4.2	<i>Immunhistologie</i> :.....	56
3.2.4.3	<i>TRAP</i> :.....	58
3.3	QUANTIFIZIERUNG (IMMUNHISTOLOGIE, TRAP).....	59
3.3.1	<i>Quantifizierung der EDI- Reaktivität im Perioist</i> :.....	59
3.3.2	<i>Quantifizierung der EDI- Reaktivität im Endost</i> :.....	60
3.3.3	<i>Quantifizierung der TRAP-Aktivität im Perioist</i> :.....	61
3.3.4	<i>Quantifizierung der TRAP-Aktivität im Endost</i> :.....	62
3.4	WEITERE ERGEBNISSE:.....	63
3.4.1	<i>Radiologie</i> .....	63

3.4.2	<i>Biomechanik</i> .....	64
3.4.3	<i>Histologie und Histomorphometrie</i> .....	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>65</b>
4.1	ALLG. ÜBERBLICK + PROBLEMHINFÜHRUNG .....	65
4.2	EIGENE STUDIE.....	66
4.3	EIGENE ERGEBNISSE.....	66
4.4	VERSCHIEBUNG DER INFLAMMATORISCHEN REAKTION DURCH BESCHLEUNIGUNG DER FRAKTURHEILUNG.....	68
4.5	POLYMERBEDINGTE FREMDKÖRPERREAKTION.....	70
4.6	APPLIKATIONSMETHODEN VON WIRKSUBSTANZEN.....	73
4.7	NEBENWIRKUNGEN VON WACHSTUMSFAKTOREN.....	75
4.8	WACHSTUMSFAKTOREN UND MAKROPHAGEN .....	78
4.9	WACHSTUMSFAKTOREN UND OSTEOKLASTEN .....	80
4.10	METHODE, BEURTEILUNG DER BIOKOMPATIBILITÄT.....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG:</b> .....	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>97</b>

### 1 Einleitung

Die Behandlung komplexer Frakturen der Röhrenknochen stellt nach wie vor ein großes Problem in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Trotz ständig weiterentwickelter Therapieoptionen, treten nicht selten Komplikationen wie reduzierte oder verzögerte Frakturheilung, Pseudarthrosenbildung oder Infektionen nach der Versorgung auf. Eine Vielzahl der Komplikationen korreliert dabei direkt mit der Behandlungsdauer.

Die Heilung einer Tibiaschaftfraktur beispielsweise erfolgt in aller Regel innerhalb von 4 – 5 Monaten. In 5 – 25 % der Fälle ist jedoch mit einer verzögerten Frakturheilung oder Pseudarthrosenbildung zu rechnen. Ursachen für diese unzureichende Frakturheilung sind zum einen mechanische Faktoren wie Instabilität oder ein mangelnder Fragmentkontakt. Zum anderen beeinträchtigen aber biologische Faktoren wie eine fehlende Gefäßversorgung mit konsekutiver Knochennekrose die Heilung von Frakturen [1].

Zahlreiche in vivo Studien haben gezeigt, dass durch die exogene Applikation von Wachstumsfaktoren, wie insulin-like growth factor-1 (IGF – 1) und transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF –  $\beta$ 1), die Knochenheilung beschleunigt und die Komplikationsrate bei der Behandlung von Frakturen verringert werden kann [2, 3]. Auch in vitro Untersuchungen zeigten das hohe Stimulationspotential dieser Faktoren auf osteogene oder chondrogene Zellen [4]. Bisher erfolgte die klinische Zulassung für strenge Indikationen bereits für Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) bei akuten, offenen Tibiafrakturen [5] und BMP-7 bei der Therapie von tibialen Pseudarthrosen [6]. Ein Problem stellt jedoch nach wie vor die Applikation dieser bioaktiven Substanzen dar. Dies gilt insbesondere unter Berücksichtigung der Gefahr einer ektopen Knochenbildung der bisher favorisierten BMP. Verschiedene Ansatzpunkte wie die systemische Applikation oder die lokale Verabreichung mittels Injektionen bzw. die Implantation von Trägermaterialien wie z.B. Kollagenschwämme bergen zahlreiche weitere Risiken [7, 8].

Die kontinuierliche Freisetzung von Wirksubstanzen aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung (PDLLA) stellt eine mögliche,

komplikationsärmere Alternative dar [9].

Vorteile dieser Applikationsmethode sind die kontrollierte und lokale Abgabe der inkorporierten Substanzen [10] sowie die Kombination eines bereits etablierten, stabilisierenden Osteosyntheseverfahrens mit der Möglichkeit einer regulierten Freisetzung von Wachstumsfaktoren [3, 10]. Der stufenweise Abbau und die komplette Metabolisierung der biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung sind ebenfalls wünschenswert, um langfristige, polymerbedingte Fremdkörperreaktionen, deren Korrelat um das Implantatlager herum auftretende Osteolysen sind, zu vermeiden [11].

Nachdem die gute Biokompatibilität biodegradierbarer Polymere in Nahtmaterialien sowohl im Tierexperiment als auch in klinischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, wurden diverse resorbierbare Materialien entwickelt, die in unterschiedliche Teilbereiche der Medizin Einzug erhielten. Im klinischen Alltag findet man heute neben den altbewährten biodegradierbaren Nahtmaterialien resorbierbare Clips, Schrauben, Platten und Membranen [12, 13]. Die in den 80er Jahren in der Unfallchirurgie und orthopädischen Chirurgie zur Frakturstabilisierung eingesetzten Polyglykosid – Implantate (PGA) und Polylaktid-Implantate (PLLA) waren zunächst vielversprechend [14]. Kurz darauf tauchten jedoch erste Berichte über Fremdkörperreaktionen auf [15, 16]. Um das Ausmaß und die Gefahren dieser Reaktionen einschätzen und gegenüber dem Nutzen abwägen zu können, sind sorgfältige Untersuchungen beim Einsatz von Polymeren notwendig. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung als Wirkstoffträger für die Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- $\beta$ 1 in Bezug auf mögliche inflammatorische Reaktionen während der Knochenheilung im Rattenmodell zu evaluieren.

### **1.1 Biomaterialien**

In Anlehnung an Williams (1987) sind Biomaterialien Materialien, die als Implantate oder medizinische Unterstützungssysteme mit biologischen Systemen interagieren [17]. Biomaterialien werden seit mehreren Jahrzehnten

## Einleitung

---

in zunehmendem Ausmaß in den verschiedensten medizinischen und nicht-medizinischen Fachbereichen eingesetzt.

**Tabelle 1:** Einsatz von Biomaterialien in unterschiedlichen Fachbereichen [18]

**TABLE 1** Uses for biomaterials (almost A to Z)

Medical uses	Non-medical uses
Artery graft	Arrays for DNA and diagnostics
Breast implant	Bioremediation materials
Cochlear implant	Biosensors
Ear drainage tube	Bioseparations, chromatography
Dental implant	Biofouling-resistant materials
Feeding tube	Biomimetics for new materials
Glaucoma drainage tube	Cell culture
Hydrocephalous shunt	Controlled release for agriculture
Intraocular lens	Electrophoresis materials
Joints (hip, knee, shoulder)	Fuel cells (biomass)
Keratoprosthesis	MEMS
Left ventricular assist device (LVAD)	Muscles (artificial) and actuators
Mechanical heart valve	Nanofabrication
Nerve guidance tube	NEMS
Ophthalmic drug delivery device	Neural computing/biocomputer
Pacemaker	Smart clothing for biowarfare
Renal dialyzer	Yeast array chip
Stent	
Tissue adhesive	
Urinary catheter	
Valve, heart	
Wound dressing	
X-ray guide	
Zirconium knee joint	

Die Anwendungen reichen von den in der Kardiologie und Kardiochirurgie verwendeten Stents und Herzschrittmachern über Zahn- und Brustimplantate bis zu den in der Unfallchirurgie und Orthopädie eingesetzten totalen Endoprothesen. Neben diesen permanenten Implantaten haben temporäre Stabilisationsverfahren in der Traumatologie Einzug erhalten. Hierzu gehören beispielsweise Platten- und Schraubenosteosynthesen sowie die Frakturstabilisierung mittels intramedullärer Nägel.

### 1.2 Biokompatibilität von Biomaterialien

In Hinsicht auf die zunehmende Verwendung von Biomaterialien in der Medizin ist es zwingend erforderlich, die Interaktionen zwischen dem Empfängergewebe

und dem Implantat und somit die Biokompatibilität zu verstehen [19]. Die Biokompatibilität ist das Maß für die Verträglichkeit eines Fremdkörpers für das umliegende Gewebe. Eine vollständige Übereinstimmung in der Terminologie wird nach wie vor nicht erreicht. Die European Society for Biomaterials (ESB) definiert Biokompatibilität wie folgt: „Biocompatibility is defined as the ability of a biomaterial to perform with an appropriate host response on a specific application.“ [17] Somit beschreibt Biokompatibilität die Fähigkeit eines Materials, seine Aufgabe einer spezifischen Anwendung, ohne klinisch relevante Reaktion im Empfängergewebe zu erfüllen. Andere Autoren wie Wintermantel und Mayer erweitern diese Definition um zwei Unterbegriffe: a) die Oberflächenkompatibilität, welche die chemische, biologische und physikalische Eignung eines Implantates beinhaltet, und b) die Strukturkompatibilität, die sich auf die optimale Adaptation an das mechanische Verhalten des Empfängergewebes bezieht [20]. Letztere strebt also eine möglichst gute mechanische und strukturelle Nachahmung des ersetzten oder unterstützten Gewebes an. Zusammengefasst beschreibt Biokompatibilität somit prinzipiell das Grenzflächenproblem zwischen einem biologischen Material oder Medizinprodukt auf der einen und einem biologischen System auf der anderen Seite [12]. Die Gewebeverträglichkeit eines Biomaterials ist also sowohl von vielen verschiedenen gewebe- wie auch materialspezifischen Parametern abhängig. Beeinflussende Faktoren des Empfängergewebes sind u.a.: 1) die Spezies, 2) der Implantationsort [21]. Die Haupteinflussfaktoren des Materials sind hingegen: 1) die Form, 2) die Größe, 3) die Oberflächenbeschaffenheit, 4) das Design, 5) die Morphologie und Porosität, 6) die Zusammensetzung, 7) die Sterilität, 8) die Kontaktdauer mit dem Empfängergewebe und bei biodegradierbaren Materialien 9) das Degradationsverhalten [22].

Darüber hinaus spielen allerdings auch andere Faktoren wie z.B. Größe des Operationstraumas und der Gesundheitszustand des Patienten eine Rolle bei der Gewebeakzeptanz eines Biomaterials [23]. In Bezug auf die Oberflächenkompatibilität können schließlich folgende Materialien unterschieden werden:

- biotolerante Materialien, die vom umliegenden Gewebe als fremd anerkannt, aber nicht abgestoßen werden
- bioinerte Materialien, die nach Implantation weder ihre Struktur ändern, noch mit ihrer Umgebung chemische Bindungen eingehen
- bioaktive Materialien, die sowohl chemische wie auch biologische Wechselwirkungen mit dem Empfängerorganismus eingehen

Auf der anderen Seite gilt ein Biomaterial als biologisch inkompatibel, wenn es durch die Freisetzung von toxischen Substanzen im umliegenden Gewebe zu Entzündungen, Allergien, Nekrosen oder Abstoßung führt.

### **1.3 Wechselwirkungen von Geweben und Implantaten**

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Biomaterialien machen es notwendig, mögliche Komplikationen zu kennen und sie durch eine stetige Verbesserung der biokompatiblen Eigenschaften zu minimieren oder besser noch zu verhindern. Neben ablaufenden fibrotischen oder koagulatorischen Prozessen, wie beispielsweise exzessiven Fibrosen oder Thrombosen, spielen dabei Infektionen, Funktionsbeeinträchtigungen oder Implantatlockerungen eine wichtige Rolle [24].

Eine der häufigsten und wichtigsten Komplikationen ist jedoch eine fortschreitende inflammatorische Reaktion, als Ausdruck einer mangelnden oder fehlenden Gewebeverträglichkeit. Darüber hinaus ist hinlänglich bekannt, dass eine ausgeprägte Entzündungsreaktion ein limitierender Faktor bei der Einheilung eines Implantates ist und die Inzidenz von Implantatlockerungen erhöht [25]. Hierbei spielen, insbesondere bei der Lockerung von Endoprothesen, pathologische Knochenresorptionsvorgänge eine entscheidende Rolle [26].

Trotz der häufig bioinerten, nicht-reaktiven und nicht-toxischen Eigenschaften der meisten Materialien triggert die Implantation eines Biomaterials in vielen

## Einleitung

Fällen zunächst eine akute und im Verlauf möglicherweise eine chronische Entzündungsreaktion (Abb. 1-4) durch das Einbringen eines Fremdkörpers [27]. Mikroskopisches Korrelat dieser Inflammation ist die Akkumulation von phagozytierenden Zellen [27]. Ursächlich hierfür sind zytokinvermittelte Interaktionen zwischen dem Polymer und Makrophagen (Abb. 1). Endpunkt der Entzündungskaskade ist in einigen Fällen schließlich eine Fremdkörperreaktion, die in eine fibröse Abkapselung des Implantates durch Granulationsgewebe mündet [28].

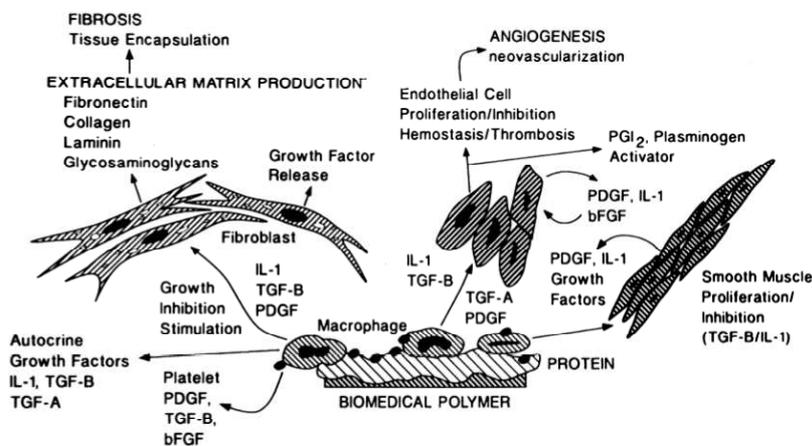


Abb. 1: Zytokinvermittelte Interaktionen zwischen Polymer und Makrophagen [28]

Im Folgenden wird die Pathogenese dieser drei Stadien der Inflammation näher betrachtet.

### 1.4 Akute Phase Reaktion

Unabhängig von der Ätiologie einer Fremdkörperreaktion ist das vom Organismus verfolgte Ziel immer das gleiche: 1) die fortschreitende Gewebeschädigung zu vermeiden, 2) das Fremdmaterial zu isolieren, zu zerstören und schließlich 3) die Geweberegeneration zu aktivieren [21]. In der Frühphase kommt es hierbei zu einer sogenannten akuten Phase Reaktion, die das Implantat zerstören oder aber in eine chronische Entzündungsreaktion übergehen kann.

## Einleitung

---

Unmittelbar nach der Implantation kommt es zu einer Anlagerung von Empfängerproteinen an die Oberfläche des Implantates (Abb. 2).

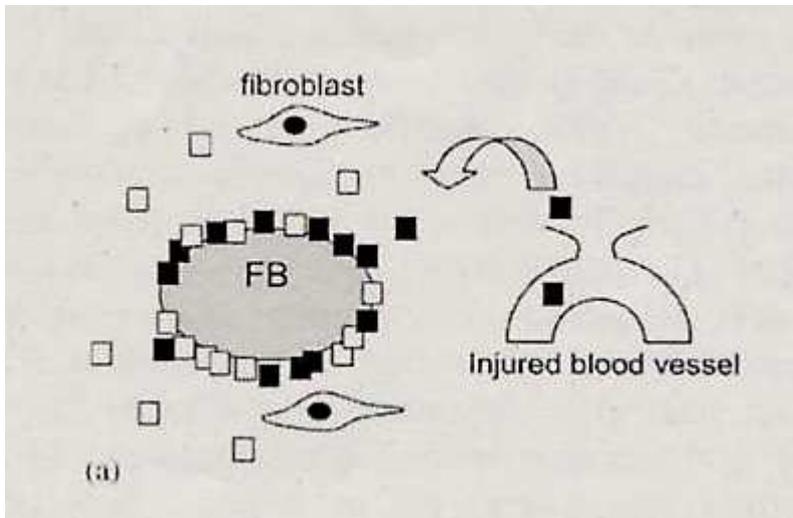


Abb. 2: Anlagerung von Empfängerproteinen aus dem Blut an die Implantatoberfläche aus Fournier et al.[21]

An dieser unspezifischen Reaktion beteiligen sich mehr als 200 unterschiedliche Proteine [29]. Es handelt sich dabei sowohl um Proteine aus dem Blut als auch um flüssige Gewebsproteine (z.B. Immunglobuline, Fibrinogen, Komplementfaktoren, Antithrombin III, Fibronectin, Laminin etc.) [22]. Für die akute Entzündungsantwort spielt dabei das Fibrinogen die wichtigste Rolle. Tang et al. zeigten in einer Studie, dass die intraperitoneale und subkutane Implantation von mit Fibrinogen oder Plasma beschichteten Biomaterialien zu einer deutlichen Akkumulation von phagozytierenden Zellen führt. Albumin und Immunglobulin G, die neben Fibrinogen auf der Implantatoberfläche dominieren, scheinen hingegen für die Auslösung einer inflammatorischen Reaktion keine Rolle zu spielen [24]. Wie auch die anderen Proteine lagert sich das Fibrinogen in seiner vollständigen oder denaturierten Form als ungeordnete Schicht dem Fremdmaterial an. Die Schicht (Abb. 2) verhindert zunächst den direkten Kontakt zwischen dem Biomaterial und den inflammatorischen Zellen des Empfängers [21]. Sie bildet mit dem Biomaterial eine so starke Einheit, dass sie sich selbst mit starken Lösungsmitteln nicht ablösen lässt [24]. Diese Stabilität ist ein wichtiger Faktor für die Biokompatibilität des Implantates [24]. Die Integrität der Proteinschicht

## Einleitung

---

verhindert die Präsentation von antigenen Strukturen, sogenannten Epitopen, an phagozytierende Zellen, wie beispielsweise Makrophagen [24]. Ein direkter Kontakt zwischen Empfängerzellen und dem Implantat wird somit verhindert [30]. Erst durch Konformationsänderungen in der Proteinschicht kommt es zu einer Interaktion zwischen körperfremdem Epitop und körpereigenen inflammatorischen Zellen (Abb. 3).

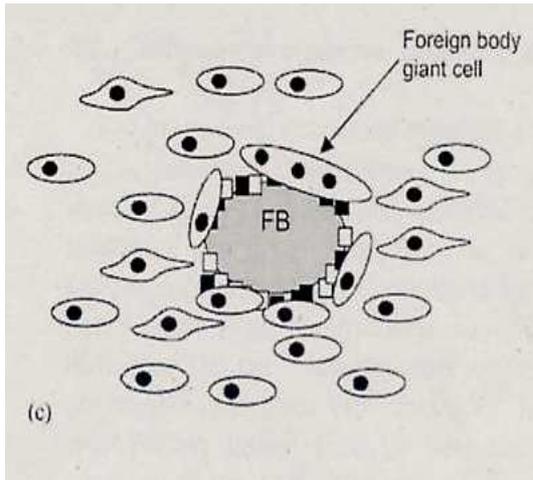


Abb. 3: Proliferation von Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen aus Fournier et al. [21]

Dieses Phänomen, welches zu einer vermehrten Phagozytose des Fremdmaterials führt, wird Opsonisierung genannt. Dabei initiiert die Proteinschicht eine Translation verschiedener Implantateigenschaften, wie Struktur und Zusammensetzung des Fremdmaterials, in eine biologische Sprache, auf die verschiedene körpereigene Zellen reagieren können [30]. Da die Verankerung der unterschiedlichen Zellen von der Proteinzusammensetzung abhängig ist, spielt sie eine entscheidende Schlüsselrolle und bestimmt den weiteren Verlauf. Durch Stimulation der richtigen Zellen kann so eine konstruktive Zellantwort getriggert werden, die schließlich zu Wundheilung und Gewebsintegration des Implantates führt. Auf der anderen Seite induziert eine für körpereigene Zellen nicht lesbare Proteinschicht die Implantatisolation oder -abstoßung [30].

Durch die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und weiteren chemotaktisch wirksamen Molekülen kommt es schließlich zur Anlagerung von Leukozyten an das Endothel benachbarter Gefäße mit konsekutiver

interstitieller Infiltration dieser weißen Blutzellen in das Gewebe [28] (s. Abb. 1). Zahlenmässig überwiegen zu diesem Zeitpunkt neutrophile Granulozyten. Ihre Aufgabe ist die Beseitigung von Fremdmaterial durch Phagozytose [29]. Darüber hinaus sind sie zur Exozytose von Enzymen befähigt, wenn der opsonierte Fremdkörper nicht phagozytiert werden kann. Somit wird der nachfolgende Entzündungsprozess aufrechterhalten [25]. Wright und Gallin et al. konnten anhand von in vitro Studien belegen, dass erst die oben bereits beschriebene Implantat-Protein-Zell-Interaktion zur Enzymfreisetzung aus den Neutrophilen führt [31]. Neben den neutrophilen Granulozyten lagern sich außerdem frühzeitig Monozyten / Makrophagen an das proteinbedeckte Implantat an. Ihre rezeptorvermittelte Bindung über Opsonine der Implantat-Protein-Oberfläche führt zur Aktivierung der Zellen mit nachfolgender Sekretion von Radikalen, proteolytischen Enzymen und in Abhängigkeit von der Implantatgröße ebenfalls zur Phagozytose [28]. Obwohl bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nachweisbar, spielen sie jedoch neben den Fibroblasten vor allem die Hauptrolle bei der chronischen Entzündungsreaktion [21, 24].

### **1.5 Chronische Entzündungsreaktion und Fremdkörperreaktion (FBR)**

Kommt es zur Persistenz des inflammatorischen Stimulus, so resultiert hieraus eine chronische Entzündung. Von einigen Autoren wird dabei weiter zwischen einer chronischen Entzündung im klassischen Sinne auf der einen und einer Fremdkörperreaktion (FBR) auf der anderen Seite unterschieden [25]. Während erstere durch die Präsenz von mononukleären Zellen, Lymphozyten und antikörperproduzierenden Plasmazellen charakterisiert ist, zeichnet sich die FBR vor allem durch die Proliferation von Makrophagen und Fibroblasten aus [21, 25]. Da in Abhängigkeit von der Implantatgröße eine Phagozytose durch Makrophagen nicht immer möglich ist, fusionieren diese zu effizienteren mehrkernigen Riesenzellen (FBGC), die sich auf der Implantatoberfläche ausbreiten [21, 25]. Bei sehr großen Implantaten, wie beispielsweise Total-Endoprothesen oder intramedullären Kraftträgern, bleibt die Phagozytose weiterhin frustan. Durch die Sekretion verschiedener Mediatoren (z.B. IL-1,

## Einleitung

---

TGF- $\beta$ ) kommt es schließlich zur Aktivierung und Proliferation der Fibroblasten [21]. Diese synthetisieren und sezernieren Kollagene und Proteoglykane. Somit entsteht eine bindegewebige Kapsel, die das Implantat vom umliegenden Gewebe abgrenzt (Abb. 4) [21].

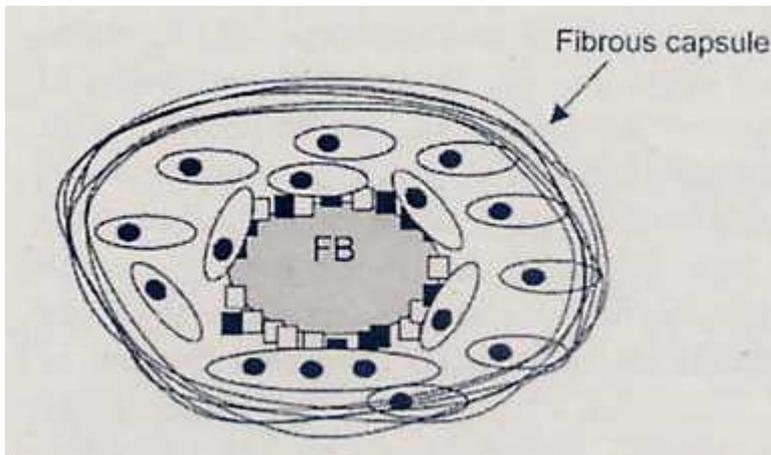


Abb. 4: Ausbildung einer, den Empfänger schützenden, bindegewebigen Kapsel aus Fournier et al. [21]

Es gilt zu berücksichtigen, dass diese Fremdkörperreaktion, bestehend aus FBGC, Granulationsgewebe und fibröser Kapsel keinesfalls eine fehlende Biokompatibilität bedeutet. Vielmehr ist sie in vielen Fällen Ausdruck einer normalen Antwort des Empfängergewebes auf Fremdmaterial [21, 25].

### 1.6 Die Rolle von Makrophagen

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, nehmen die Makrophagen eine zentrale Stellung in der Pathogenese der inflammatorischen, vor allem chronischen, Reaktion ein und werden als die Determinanten der Biokompatibilität angesehen [21, 25, 32]. Bereits während der akuten Phase Reaktion werden chemotaktisch angelockte Monozyten zur Differenzierung in Makrophagen stimuliert. Ihre Aktivierung zieht eine Reihe von zellulären Interaktionen sowie die Freisetzung verschiedener Faktoren, wie bspw. Vascular endothelial growth factor (VEGF) oder Basic fibroblast growth factor (bFGF) nach sich [33]. Diese beeinflussen u.a. das Fibroblastenwachstum, die Angiogenese, sowie die Proliferation und Proteinsynthese von anderen, an der

## Einleitung

---

Wundheilung beteiligten Zellen [25]. Wenn möglich schließt sich an die Bindung die Phagozytose und Degradierung des Fremdmaterials an [34]. Um den Phagozytoseprozess zu optimieren, können einzelne Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen fusionieren. Durch die Aufnahme, Prozessierung und anschließende Präsentation der antigenen Bestandteile an spezifische Immunzellen wie bspw. Lymphozyten, stellen die Makrophagen das Bindeglied zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort dar. Im Falle einer sog. frustrierten Phagozytose (s.o.) kommt es schließlich zur Sekretion von verschiedenen Zytokinen wie bspw. IL-1, IL-6 oder TNF-alpha [25]. Die Art der sezernierten Faktoren und ihre Quantität ist dabei abhängig von den jeweiligen an das Implantat gebundenen Oponinen und damit konsekutiv vom verwendeten Material [35].

Endpunkt einer fortschreitenden Fibroblastenstimulation und –proliferation durch die verschiedenen Zytokine ist die Abkapselung des Fremdmaterials.

Ob Makrophagen ebenso wie die im folgenden Kapitel beschriebenen Osteoklasten an der Knochenresorption beteiligt sind, wird nach wie vor kontrovers diskutiert [36-38]. Murray et al. zeigten in ihrer Studie, dass Makrophagen durchaus in der Lage sind, Knochen zu resorbieren, wenn auch in einer langsameren Art und Weise als Osteoklasten [39]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass phagozytotisch aktive Makrophagen die Knochenresorption bis zum 15fachen im Vergleich zu inaktiven Kontrollmakrophagen steigern. In einem in vitro Versuch wurde dabei gezeigt, dass die Phagozytose in Abhängigkeit von der Menge, aber unabhängig von der Zusammensetzung des Materials zu einer Aktivierung von Makrophagen führt [39].

Unbestritten ist hingegen, dass Makrophagen in jedem Fall Osteoklasten zur Knochenresorption anregen können. Da diese osteolytischen Veränderungen zweifelsohne als ein Manifestationsstadium der Fremdkörperreaktion angesehen werden können, sind sie somit passiv am Knochenabbau beteiligt. Auch andere Studien lassen vermuten, dass durch Makrophagen phagozytierte Abriebpartikel Osteolysen induzieren können. So ergab die histologische

Untersuchung von periimplantärem Gewebe, dass die fibröse und synovia-ähnliche Pseudomembran, die das Implantat umgibt, neben Fibroblasten und Makrophagen auch eine große Anzahl von phagozytierbaren Partikeln enthält [40]. Diese stimulieren ihrerseits in vitro die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha, die die Knochenresorption anregen [40].

Auch wenn noch viele Fragen bezüglich der Knochenresorption offen bleiben, gilt es als gesichert, dass Makrophagen und Osteoklasten aufgrund überlappender morphologischer, enzymatischer, histochemischer, immunhistochemischer und funktioneller Kriterien von einer gemeinsamen Präkursorzelle abstammen und gemeinsame Entwicklungsstadien durchlaufen [36].

### **1.7 Die Rolle von Osteoklasten**

Neben den o.g. Makrophagen, denen in einigen Studien (s.o.) eine eigene Resorptionsfähigkeit zugeschrieben wird, sind es vor allem aktivierte Osteoklasten, die in der Lage sind Knochen sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen abzubauen [40]. Dabei handelt es sich um hoch spezialisierte, mehrkernige Zellen. Neben ihrer typischen geriffelten Oberfläche, der sog. ruffled border, sind sie reich an Mitochondrien. Darüber hinaus lässt sich in ihnen als weiteres Charakteristikum die Tartrat Resistente Saure Phosphatase (TRAP) nachweisen, die als anerkannter Marker für Osteoklasten gilt [41, 42]. Dieses Enzym lässt sich auch im Serum nachweisen und ist hier ein wichtiges Indiz für die aktuelle Resorptionsaktivität. Osteoklasten entstehen durch die Fusion von im Kreislauf zirkulierenden mononukleären Präkursorzellen, die im Blut in der CD14+ Fraktion der Monozyten zu finden sind [43]. Somit gehören die Vorläuferzellen der Osteoklasten, wie auch Monozyten und Makrophagen, zum sog. mononukleären Phagozytosesystem (MPS) [44]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass auch eine Differenzierung von Makrophagen in knochenresorbierende Osteoklasten möglich ist [45]. Sabokbar et al. wiesen ebenso wie Udagwa et al. eine Osteoklastenbildung nach, wenn Makrophagen eines entzündlichen Infiltrates

mit Osteoblasten co-kultiviert werden [46]. Dazu sind allerdings als wichtige Co-Faktoren Vitamin D3 (1,25 Dihydroxycholecalciferol) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) erforderlich [47]. Sind diese Voraussetzungen gegeben, so kommt es an der Knochen-Implantat-Grenze unter Einfluss von Chemotaxinen zur Akkumulation von osteoklastären Vorstufen in Form von Makrophagen [48]. Da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass Abriebpartikel von Implantaten die Formierung und Aktivität von Osteoklasten und somit konsekutiv den Knochenabbau in hohem Maße beeinflussen [40, 47], sind sie ebenso wie die Makrophagen Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit.

### **1.8 Biodegradierbare Polymere**

Ein Großteil der heutzutage verwendeten Biomaterialien sind nach wie vor Metalle wie beispielsweise rostfreier Edelstahl oder Titan. Darüber hinaus kommen Keramiken und nicht-degradierbare Polymere, z.B. Polyamide, zum Einsatz. Seit Mitte der 1980 - Jahre werden jedoch in zunehmendem Maße auch biodegradierbare Implantate in der Unfallchirurgie eingesetzt [19].

Neben den häufig verwendeten Polydioxanonen (PDS), sind die Polyglykolide (PGA) und die Polylaktide (PLA) bzw. deren Co-Polymere zunehmend in den Mittelpunkt des medizinischen Interesses gerückt [49]. Hierbei handelt es sich um Poly(alpha-hydroxycarbonsäuren). Diese können unter anderem durch Ringöffnung und anschließende Ringpolymerisation ihrer Dimere, den Diglykoliden bzw. Dilaktiden, synthetisiert werden, welche ihrerseits durch Dehydratisierung aus den jeweiligen alpha-Hydroxycarbonsäuren entstehen [13].

Unterschiede zwischen diesen synthetisch hergestellten Polymeren ergeben sich hinsichtlich des chemischen Aufbaus und ihrer Eigenschaften [12]. Während Polyglykolide eine relativ hohe Kristallinität von 40-55% aufweisen, ist der Zustand der Polylaktide abhängig von ihrer Polymerzusammensetzung. So ist beispielsweise das Poly(D,L-Laktid) vollständig amorph, wohingegen Poly(L-Laktid) eine Kristallinität von 37% aufweist [12]. Dies hat auch einen

entscheidenden Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit und das Degradationsverhalten, welche im Rahmen der Knochenheilung von besonderem Interesse sind. Je höher der amorphe Anteil des Polymers ist, desto größer ist die Degradationsgeschwindigkeit [50]. Für die Polylaktide bedeutet dies eine schnellere Degradation des amorphen Poly(D,L-Laktid) gegenüber dem semikristallinen Poly(L-Laktid). Insgesamt sind die Degradationsgeschwindigkeiten beider Polylaktidkompositionen jedoch deutlich langsamer als bei den innerhalb von einigen Monaten degradierenden Polyglykoliden [51, 52].

Ziel ist es, durch die Steuerung der Geschwindigkeit des Abbaus den Verlust der Steifigkeit und den Volumenabbau zu koordinieren und damit zu optimieren [53]. Ein zu schneller Abbau könnte so zu einer Instabilität im Frakturbereich führen, wohingegen eine zu langsame Degradation die Gefahr von fremdkörperbedingten Komplikationen mit sich bringen könnte. Auf der anderen Seite birgt eine zu schnelle Degradation ebenfalls eine erhöhte Gefahr von Fremdkörperreaktionen. Weitere Faktoren, die auf die Degradation Einfluss nehmen, sind: die Größe des Implantats, das Molekulargewicht, der Abbaumechanismus, die Implantatlokalisierung und die im Frakturbereich wirkenden Kräfte [19]. Sie wird durch chemische, thermische und physikalische Mechanismen beeinflusst [54]. Die Spaltprodukte der überwiegend hydrolytisch ablaufenden Prozesse gelangen schließlich in den Citrat-Zyklus und werden dort metabolisiert [11]. Eine deutlich geringere Bedeutung haben nicht-spezifische enzymatische Reaktionen. Trotz der vielversprechenden Erfolge im Tierexperiment und in der Klinik muss in jedem Fall vor der Etablierung von Biomaterialien im klinischen Alltag die Sicherheit des Patienten gewährleistet werden. In Bezug auf die in der Unfallchirurgie und Orthopädie verwendeten Implantate bedeutet dies neben dem sicheren Ausschluss von Toxizität und Mutagenität des jeweiligen Materials die Sicherstellung einer guten Gewebeverträglichkeit. Einer subkutanen oder intramuskulären Biokompatibilitätstestung sollte sich in jedem Fall eine Untersuchung zum Degradationsverhalten des jeweiligen Materials im Knochengewebe anschließen [19].

### 1.9 Biokompatibilität von degradierbaren Polymeren

Die bei Verwendung von biodegradierbaren Osteosynthesematerialien auftretenden Komplikationen reichen von der Ausbildung aseptischer Fisteln [55] über zum Teil intensive Weichteilreaktionen bis hin zu osteolytischen Veränderungen [15]. Diese zuvor schon beschriebenen und durch lokale Entzündungen und Fremdkörperreaktionen hervorgerufenen Veränderungen wurden bei Anwendung von biodegradierbaren Implantaten in Abhängigkeit von der Polymerzusammensetzung beobachtet [56]. Sie liessen sich bei der Verwendung von Polyglykoliden in bis zu 40% der Fälle nachweisen [57]. Im Vergleich dazu zeigten sich bei den Polylaktiden nur sporadisch inflammatorische Reaktionen [56]. In vitro Studien zeigten keinen negativen Effekt einer Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung eines Titannagels auf Osteoblasten und Osteoklasten [4, 58]. Zudem liess sich keine Immunantwort in kultivierten Maus-Monozyten/-Makrophagen nachweisen, was für eine gute Biokompatibilität spricht [4].

Nach wie vor sind die Ursachen für das Auftreten der o.g. Komplikationen nicht eindeutig geklärt und es existieren viele Theorien. Manche Untersuchungen sprechen für einen Einfluss der Degradationsgeschwindigkeit des Polymers. Obwohl die Häufigkeit von beobachteten Fremdkörperreaktionen bei langsam degradierbaren Polymeren wie beispielsweise homopolymeren Polylaktiden unbeständig ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Inzidenz von Komplikationen bei ihnen geringer ist als diejenige bei schnell degradierbaren Polymeren wie z.B. Polyglykoliden [59]. Allerdings scheint eine zu langsame Degradation über mehrere Jahre wie z.B. bei Poly(L-Laktid) ebenfalls einen Nachteil darzustellen [59]. Somit wurde nach Polymeren gesucht, die sich der Geschwindigkeit der Frakturheilung anpassen. Ein Beispiel hierfür ist das in der vorliegenden Arbeit verwendete stereocopolymere Poly(D,L-Laktid). Dieses bietet die Möglichkeit, als Trägermaterial von bioaktiven Substanzen wie beispielsweise Wachstumsfaktoren zu fungieren.

### 1.10 Applikation von Wirksubstanzen

Bisher wurden bioaktive Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren in experimentellen Studien überwiegend systemisch, durch intravenöse Injektionen und Katheter, oder lokal, unter Zuhilfenahme osmotischer Minipumpen sowie durch subperiostale Injektionen verabreicht [60-64]. Eine weitere Möglichkeit der lokalen Applikation ist die Einarbeitung der Substanzen in eine Vielzahl von Trägermaterialien wie beispielsweise Kollagenschwämme, Gele, Membranen oder Polylaktidblöcke, welche dann operativ direkt am gewünschten Wirkort eingebracht werden [65].

Ein großes Problem dieser verwendeten Applikationstechniken stellen die unerwünschten Nebenwirkungen sowie die zum Teil unpraktikable klinische Anwendung dar. So lässt sich bei der lokalen Injektion von TGF- $\beta$ 1 eine ausgeprägte Ödembildung beobachten [7]. Des Weiteren stellt jede Injektion die Gefahr einer Infektion durch verschleppte Keime sowie einer gestörten Wundheilung durch das anfallende Mikrotrauma dar. Das Problem der bisher verwendeten Trägermaterialien wie z.B. der Kollagenschwämme besteht darin, dass sie zum Großteil aus bovinem Material hergestellt werden. Für sie werden in der Literatur vereinzelt allergische Reaktionen beschrieben [66]. Zudem beschrieben Sorensen et al. 1990 eine nicht kontinuierliche und zu schnelle Freisetzung der eingearbeiteten Faktoren [67]. Außerdem muß zu ihrer Implantation das Frakturgebiet eröffnet und der Carrier direkt platziert werden. Dies erhöht die Gefahr lokaler Infektionen und kann durch die Gefahr sekundärer Dislokationen einen Folgeeingriff notwendig machen. Die systemische Applikation birgt ein besonderes Risiko, da die verwendeten Substanzen nicht spezifisch auf Zellen des Knochenstoffwechsels wirken. So lassen sich in Abhängigkeit von der Konzentration bei der systemischen Verabreichung von IGF-I eine Vielzahl von Komplikationen wie Elektrolytverschiebungen, Änderungen der Konzentrationen von Insulin und Wachstumsfaktor im Serum, Hypoglykämien, Hyperkalcurien, Ausbildung eines Pseudotumor cerebri, Krampfanfälle, Papillenödeme, Fazialisparesen, Parotisschwellungen, Tachykardien, Haarausfall und vermehrte Infektionen des oberen Respirationstraktes beobachten [68]. Die systemische Applikation von

TGF- $\beta$ 1 ist vor allem aufgrund der ausgeprägten immunsuppressiven Wirkung deutlich limitiert [8].

Ein relativ neuer Ansatzpunkt ist die Einarbeitung von bioaktiven Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren und Antibiotika in Polymere, welche dann als biodegradierbare Beschichtung für Osteosynthesematerialien eingesetzt werden können [10, 69].

### **1.11 Polymere als Drug Delivery Systems (DDS)**

Die Palette der heutzutage in experimentellen und klinischen Studien als Carrier und Drug Delivery Systems (DDS) verwendeten Materialien reicht von Typ-I-Kollagen [70] über Hyaluronsäuregele [71] bis hin zu synthetisch hergestellten Polymeren [72]. Poly-(Laktide) und Poly-(Glykolsäuren) bzw. ihre Co – Polymere werden bereits als „Drugcarrier“ in der Klinik verwendet. Darüber hinaus eignen sich sogenannte „bone-graft substitutes“ wie beispielsweise demineralisierte Knochenmatrix, Calciumphosphatverbindungen und Bioglass als potentielle Carrier für verschiedene Proteine [73].

Wünschenswert im Rahmen der Knochenheilung ist dabei vor allem die Kombination eines DDS mit einem stabilisierenden Implantat. Hierdurch kann neben einer ausreichenden Stabilisierung der Fraktur gleichzeitig eine lokale Stimulation der Knochenheilung erreicht werden. Des Weiteren ist die Anwendung von biodegradierbaren Materialien von Vorteil, die vom Körper resorbiert werden können und somit längerfristig keine Fremdkörper für den Organismus darstellen. Darüber hinaus spielen die Polymerdegradation und -erosion eine essenzielle Rolle bei der kontrollierten Freisetzung der verschiedenen in das Trägermaterial inkorporierten bioaktiven Substanzen [74]. Eine für den Organismus optimale Degradation mit kontinuierlicher und kontrollierter Freisetzung eingearbeiteter Faktoren kann beispielsweise durch eine Implantatbeschichtung auf der Basis von Poly(D,L-Laktid) erreicht werden [10]. Sie gewährleistet neben einer suffizienten Frakturstabilisierung eine kontinuierliche Abgabe der bioaktiven Substanzen mit einer hohen lokalen, aber nur geringen systemischen Konzentration, so dass unerwünschte systemische

Wirkungen nicht zu erwarten sind. Mittels eines sog. „kalten Beschichtungsverfahrens“ können die Wachstumsfaktoren, wie IGF-I und TGF- $\beta$ 1, in eine biodegradierbare Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung eingearbeitet werden. Eine 10 $\mu$ m dünne PDLLA Schicht zeigte dabei eine gute mechanische Stabilität auf Metalloberflächen, die einer intramedullären Implantation zu 96% standhielt.

Auch in anderen Fachbereichen der Medizin bedient man sich der lokalen Applikation von bioaktiven Molekülen aus einer biodegradierbaren Beschichtung [75]. Ein Beispiel ist die Inkorporation von antithrombotischen Medikamenten in eine PDLLA-Beschichtung für Coronar-Stents [76].

### **1.12 Freisetzung von bioaktiven Substanzen aus einer Polymerbeschichtung**

Der klinische Einsatz eines Polymers als lokaler Drug Carrier setzt voraus, dass das Degradationsverhalten der Beschichtung und damit konsekutiv die Freisetzungskinetik der jeweiligen bioaktiven Substanzen bekannt sind. Nur so kann eine genaue Dosierung sichergestellt werden. Im Falle der Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung erfolgt die Degradation überwiegend chemisch. Mechanische und physikalische Mechanismen spielen lediglich eine untergeordnete Rolle [54]. Schmidmaier et al. zeigten in einer Studie, dass die Reduktion einer PDLLA-Beschichtung mit 10% innerhalb von 9 Wochen in vitro nur unwesentlich langsamer ablief, als in vivo [69]. Der überwiegende Anteil dieser Degradationsvorgänge spielte sich dabei innerhalb der ersten 2 Tage ab.

Neben der Biodegradation sind noch zwei weitere Hauptmechanismen von besonderer Bedeutung für die kontinuierliche Freisetzung der verschiedenen Faktoren: a) die Diffusion und b) die Polymerschwellung, der eine schnelle diffusionkontrollierte Freisetzung folgt. Gerade für die Freisetzung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 scheint der Anteil der diffusionbedingten Freisetzung sehr groß zu sein, da innerhalb von 42 Tagen nach Implantation kein relevanter Massenverlust des Polymers nachweisbar ist. Ein Elutionsversuch zeigte jedoch, dass innerhalb von 48 Stunden bereits 54% des IGF-I und 48% des TGF- $\beta$ 1 aus der Beschichtung abgegeben werden [69]. Nach diesem initialen Peak erfolgte eine

konstante Freisetzung der Wachstumsfaktoren.

### **1.13 Wachstumsfaktoren (WF)**

Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurde ein Zusammenhang zwischen der Frakturheilung und einem bis dato unbekanntem Agens gesehen [77]. Heutzutage ist anerkannt, dass der Prozess der Knochenheilung durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Neben biomechanischen und zellulären Mechanismen haben Hormone (z.B. Parathormon, Vitamin D, Calcitonin) und andere Proteine wie Wachstumsfaktoren einen hohen Stellenwert [78].

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind verschiedene Wachstumsfaktoren (WF) identifiziert worden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Knochenheilung nachweisbar sind [79, 80]. Bolander et al. zeigten, dass verschiedene Gene, die für einzelne WF kodieren, während der einzelnen Phasen der Frakturheilung unterschiedlich stark exprimiert wurden [80].

Neben dem zuerst entdeckten Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) [81], finden sich in Frakturnähe Transforming growth factor –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Fibroblast growth factor (FGF), Insulin-like growth factor (IGF) und Platelet-derived growth factor (PDGF) [82]. Der Anteil dieser WF an nichtkollagenen Proteinen des Knochens beträgt dabei unter physiologischen Bedingungen allerdings weniger als 1% [83].

### **1.14 Wirkungsweise und Wirkung von Wachstumsfaktoren (WF)**

Als hochmolekulare Vorstufen freigesetzt, werden die WF durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt [84]. Dabei entfalten sie ihre Wirkung zum einen direkt, zum anderen vermitteln sie aber auch indirekt die Wirkung von systemischen Hormonen wie Parathormon, Vitamin D, Calcitonin oder Wachstumshormon (GH). So induziert beispielsweise die Ausschüttung von GH neben einem direkten Hormoneffekt die IGF-I Produktion in Leber und anderen rezeptortragenden Geweben [82]. Über autokrine, parakrine oder endokrine Wege gelangen die Mediatoren schließlich zu ihren Zielzellen, an denen sie

## Einleitung

---

regulative Aufgaben übernehmen [85]. Als Zielzellen dienen u.a. Mesenchymzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten. Neben der Regulation des Phänotyps durch verschiedene Differenzierungsvorgänge, beeinflussen die WF an diesen Zellen die Proliferation und die Matrix- und Proteinsynthese [80]. Im Folgenden sind die Quelle, die Lokalisation und einige Wirkungen der unterschiedlichen WF tabellarisch und im zeitlichen Verlauf der Knochenheilung aufgeführt:

**Tabelle 2:** Wirkungen einzelner Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung

WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung
<i>TGF-β1</i>	Von Thrombozyten und Entzündungszellen in das Frakturhämatom freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts. In proliferierenden mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und der Matrix. In mesenchymalen Zellen, jungen und reifen Chondrozyten. In der Umgebung hypertropher Chondrozyten und in Chondrozyten am Rand der Ossifikationszone.
<i>IGF-I</i>	Wird lokal und in der Leber nach Stimulation mit Wachstumshormon produziert. In proliferierenden Osteoblasten und Osteoklasten. In jungen Chondroblasten am Rand des durch Knorpel ersetzten fibrösen Gewebes. In Endothelzellen von Gefäßen.
<i>BMP-2/4</i>	In mesenchymalen Zellen des Hämatoms und der Kambiumschicht des Periosts im Frakturbereich. In den geflechtknochenaufbauenden Osteoblasten. Nimmt mit zunehmender Knochenmasse ab. In Vorläuferzellen, kurz vor deren Reifung zu Chondrozyten.
<i>PDGF</i>	Von Thrombozyten und Entzündungszellen in das Frakturhämatom freigesetzt. Am 2. Tag nach der Fraktur in Makrophagen lokalisiert, ab dem 3. Tag abnehmend. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts. Von Thrombozyten freigesetzt. Stimuliert die intramembranöse Ossifikation.
<i>aFGF</i>	In Zellen der Kambiumschicht, assoziiert mit einer Zunahme mesenchymaler Zellen. Gebildet durch Chondrozyten, ihren Vorläufern und Makrophagen. Stimuliert die Chondrozytenproliferation und –reifung.
<i>bFGF</i>	Möglicherweise von Chondrozyten gebildet. Wichtig für die enchondrale Ossifikation.

Modifiziert nach Solheim et al. 1998 [79]

Von besonderem Interesse sind die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1. Beide spielen eine entscheidende Rolle während verschiedener Entwicklungsstadien sowie im Rahmen der Knochenheilung [80, 82]. Für beide kann in vitro und in vivo ein stimulierender Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen nachgewiesen werden [8, 61].

### **1.15 Insulin-like growth factor-I (IGF-I)**

Bei Insulin-like growth factor (IGF-I) handelt es sich um einen polypeptiden Wachstumsfaktor, der zu einem Großteil in der Leber, darüber hinaus aber auch in verschiedenen anderen Zellen des Körpers, z.B. Osteoblasten, gebildet wird. Die Wirkung von IGF-I wird durch die systemische Freisetzung aus der Leber (endokrine Wirkung), durch die Bindung an membranständige Rezeptoren der produzierenden Zelle (autokrine Wirkung) oder durch die Bindung an benachbarte Zellen (parakrine Wirkung) vermittelt [82].

Die Synthese und Sekretion dieses WF wird auch durch die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) reguliert. GH ist ein systemisch zirkulierendes Hormon, das neben einem direkten auch einen über IGF-I vermittelten indirekten Effekt auf Zellen ausübt [3]. Der osteoinduktive Effekt von IGF-I wird dabei durch die Stimulation der Replikation von Osteoblasten sowie der Synthese von extrazellulärer Matrix hervorgerufen [86]. Andere Studien berichteten zudem von einer erhöhten Osteoklastenformation unter Einfluss von IGF-I [87] sowie einer verlängerten Überlebenszeit der Osteoklasten [88]. Diese Untersuchungen unterstrichen die zentrale Rolle von IGF-I und anderen IGF-Isoformen im Rahmen der Knochenheilung. Sowohl die zunächst ablaufenden resorbierenden wie auch die im Verlauf auftretenden knochenbildenden Prozesse werden durch IGF-I beeinflusst.

### **1.16 Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)**

Wie bei IGF-I handelt es sich bei TGF- $\beta$ 1 um einen polypeptiden Wachstumsfaktor. Er gehört in die Klasse der TGF- $\beta$  Superfamilie, einer großen

Gruppe von Faktoren und Zytokinen, zu der neben weiteren TGF- $\beta$  Isoformen auch die bone morphogenetic proteins, Aktivine und diverse andere sezernierte WF gehören [89]. Neben dem natürlichen Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 in der Extrazellulärmatrix des Knochens, werden TGF- $\beta$ s durch degranulierende Thrombozyten des Frakturhämatoms freigesetzt [80]. Auch hier findet eine Signaltransduktion über membranständige Rezeptoren statt [90]. Zielzellen dieser Gruppe von WF sind u.a. die an der Knochenbildung und -heilung beteiligten Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. In mehreren Studien wurde die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Knochenheilung untersucht. In Abhängigkeit von Konzentration und Zeitpunkt konnte sowohl ein stimulatorischer Effekt auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung der o.g. Zellen, wie auch ein inhibitorischer Effekt belegt werden [91, 92]. Der jeweilige Effekt ist dabei gewebs- und speziesabhängig [93]. So zeigten Beck et al. [94] in einem Knochendefektmodell am Kaninchen, dass die systemische Applikation von TGF- $\beta$ 1 die Neubildung und Proliferation von Osteoblasten stimuliert und vermehrt Knochenmatrix gebildet wird. Auf der anderen Seite zeigten Studien von Centrella [95], Noda [96] und Pfeilschifter [92] einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation verschiedener Zellen.

### **1.17 Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1**

Inzwischen gilt als sicher, dass die WF durch ihre osteoinduktiven Effekte die Knochenheilung positiv beeinflussen [8, 80]. Zahlreiche Versuche belegen dabei nicht nur die dosisabhängige Wirkung der einzelnen WF, sondern auch deren synergistischen Effekte [10, 82, 97]. So zeigten in vitro Studien, dass die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 die Matrixfreisetzung stärker stimuliert, als die jeweiligen Einzelsubstanzen [92]. Dies konnte durch in vivo Untersuchungen bestätigt werden. In Frakturmodellen an der Ratte und am Schwein liess sich nachweisen, dass die Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 die Osteotomieheilung signifikant beschleunigt [3, 10]. Daher liegt es nahe, in der Therapie der Knochenheilung eine Kombination einzelner Faktoren einzusetzen, ohne jedoch unerwünschte Nebenwirkungen durch die einzelnen

## Einleitung

---

Faktoren oder ihre Applikationssysteme hervorzurufen.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den Einfluss einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung als Wirkstoffträger für die Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- $\beta$ 1 in Bezug auf mögliche inflammatorische Reaktionen während der Knochenheilung im Rattenmodell zu evaluieren.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Im vorliegenden Versuch wurden 6 Monate alte weibliche Sprague-Dawley Ratten (Harlan – Winkelmann, Borchon, Deutschland) eingesetzt.

Bei einem künstlich aufrechterhaltenen 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus und freier Futteraufnahme wurden die Tiere maximal zu viert in einem Käfig gehalten. Die Durchführung der Versuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, unter der Versuchsnummer G 0014/98 und G0148/99, genehmigt.

### **2.2 Frakturmodell und Frakturmaschine**

Zum Erzeugen einer standardisierten Fraktur wurde ein standardisiertes Frakturmodell nach dem Prinzip der Dreipunktbiegung verwendet (Abb.5) [98]. Entsprechend der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese (AO) wurde mit dieser Methode überwiegend eine geschlossene Querfraktur (AO 42-A3.3) des rechten Tibiaschaftes mit minimalem Weichteilschaden und gleichzeitiger Fibulafraktur erzielt.

Das rechte Bein wurde auf zwei Schienen mit 20mm Abstand nach postero-lateral abduziert gelagert und der Hinterlauf mit einer Stopplatte fixiert. 2-4 mm proximal des tibiofibularen Winkels wurde auf dem Margo anterior, welcher kaum durch Weichteile bedeckt war, ein durch drei Stifte fixierter Stempel positioniert. Im Folgenden wurde dieser Stempel mit einer Masse von 650 g belastet. Dies wurde gewährleistet durch ein 600 g schweres Gewicht, dass in einer Höhe von 15 cm mittels Verriegelung gehalten wurde. Ein Lösen der Verriegelung führte zu einer Kraftwirkung auf den Stempel. Die Führung des Gewichts erfolgte hierbei durch eine Schiene. Aus der Kraftübertragung mit einem Impuls von  $p=1,12$  Ns auf den Stempel (das Ganze ist eine „Guillotine“) resultierte eine standardisierte, geschlossene Fraktur mit einem definierten Weichteilschaden.

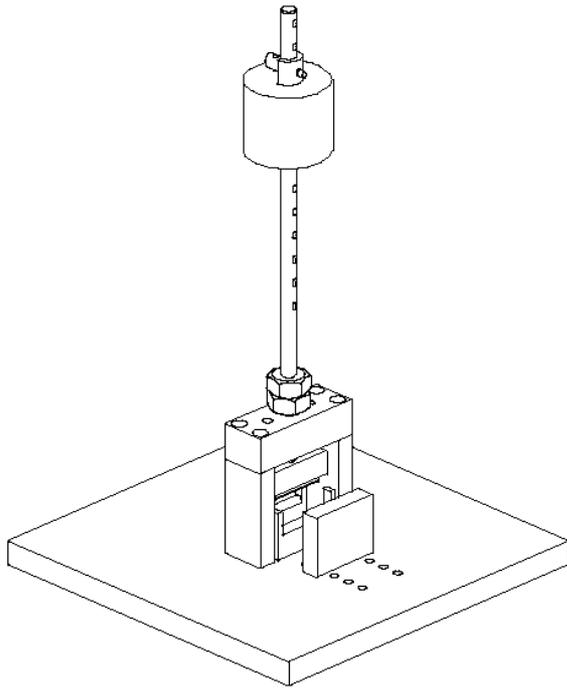


Abb. 5: Frakturmaschine nach Hoffmann [98]

### 2.3 Operatives Vorgehen

#### 2.3.1 Material

- Implantat

Intramedullärer Kraftträger (Durchmesser: 1,0 mm Kirschnerdraht aus Titan), (Synthes, Bettlach, Schweiz)

- Trägermaterial

Poly(D,L-Laktid) (PDLLA), 30 kDalton Molekulargewicht, (Boehringer Ingelheim, Mannheim, Deutschland)

- Wachstumsfaktoren

Transforming Growth Factor –  $\beta$ 1 (1% w/w PDLLA, 10  $\mu$ g pro Implantat) (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland), Insulin-like Growth Factor – 1 (5% w/w PDLLA, 50  $\mu$ g pro Implantat), (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland)

## Material & Methoden

---

- Masken- und Intraperitonealnarkose

1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran) Forene<sup>®</sup>; (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland), Ketaminhydrochlorid Ketavet<sup>®</sup> (Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich), Xylacinhydrochlorid, Xylacin 2% (Medistar<sup>®</sup> Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzwickede, Deutschland)

- Blutentnahme

Heparinnatrium, Liquemin<sup>®</sup> N25 000 000 (Roche, Grenzach, Whylen, Deutschland), Hämatokrit-Kapillaren 75mm / 60 µl, Serumröhrchen (Nümbrecht, Elsenroth, Deutschland), Blutbildröhrchen (Nümbrecht, Elsenroth, Deutschland), Eppendorfcaps, 1,5 ml

- Sonstiges

Lidocainhydrochlorid, Xylocain Gel 2% (Astra GmbH, Wedel, Deutschland), Thioglykolsäure, Pilca<sup>®</sup> (Enthaarungscreme) (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland), Ethanol 100%, Softasept N (B | Braun, Melsungen, Deutschland), Dexapanthenol, Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Bibrach / Riss, Deutschland), Kaliumchlorid 14,9 % (B | Braun, Melsungen, Deutschland), Natriumchlorid 0,9 % (B | Braun, Melsungen, Deutschland), 1 ml Einmalspritzen, Sterile Einmalhandschuhe, Mundschutz, Sterile Kompressen, Steriles OP – Tuch, Sprühpflaster, Braunes Pflaster, Leukoplast<sup>®</sup> (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland), Edding: schwarz, blau, rot zur Markierung bzw. Nummerierung der Versuchstiere

- OP – Besteck

Einmal – Skalpell No: 15, Hautfäden 4-0, Prolene<sup>®</sup>, nichtresorbierbar (Ethicon, Norderstedt, Deutschland), 1,0 mm Kirschnerdraht aus Stahl (Synthes s.o., Oberdorf, Schweiz), 0,8 mm Kirschnerdraht aus Stahl, Zange, Schere, Nadelhalter, Pinzette

- Röntgen

Mammographiefilme, Microvision C Mammography Film 24 x 30 cm (Sterling Diagnostic ImaGING Inc., Newark, USA), Röntgenkassette Cronex

Cassete Quanta Detail 24 x 30 cm (Fa. Du Pont de Nemours, Bad Homburg, Deutschland), Röntgenzahlen, Röntgentreppchen aus Aluminium, Pflaster, Entwicklerlösung, Fixierlösung

### 2.3.2 Geräte

Narkosegerät (Artec Typ Vet, Stephan GmbH Medizintechnik, Gnadenbach, Deutschland) + Schlauchsystem, 2 L Plastikgefäß (durchsichtig), Spritzenmaske), Frakturmaschine (s. Abb. 5), Thermometer (Hartmann, Heidenheim, Deutschland), Waage: Kilomat – Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland), Röntengerät Siemens Röntgenstrahler Model No.: 6077379 X037E (Siemens AG, München, Deutschland)

### 2.3.3 Narkose und Operation

Zur Sedierung der Tiere wurde zunächst eine Inhalationsnarkose durchgeführt ( $O_2$ : 0,7 l/min, Lachgas: 1,5 l/min, Isofluran: 5 Vol.%). Das Narkosegas wurde dazu in einen mit Deckel verschließbaren durchsichtigen Behälter eingeleitet. Die eigentliche Anästhesie erfolgte dann mittels intraperitonealer Injektionsnarkose (Ketaminhydrochlorid 80 mg/kg, Xylocainhydrochlorid 12 mg/kg; Verhältnis 1,5:1; 2 i.E).

Zur Desinfektion wurde das OP – Feld mit Ethanol (100%) behandelt. Der Eingriff fand unter aseptischen Bedingungen statt.

Nach einer Temperatur- und Gewichtsbestimmung wurden retrobulbär 1,5 ml Blut abgenommen (s. unten: Untersuchungen). Das zu operierende rechte Bein wurde mit dem Elektrorasierer rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme vollständig enthaart. Schließlich erfolgte die Desinfektion mit Ethanol.

Eine ca. 5 mm lange Inzision oberhalb der Tuberositas tibiae diente als Eintrittsstelle für den intramedullären Kraftträger. Hierzu wurde die Kortikalis mit einem 1 mm Stahldraht eröffnet und die Markhöhle dilatiert. Da sich die Tibia nach distal hin verjüngte, musste diese mit einem 0,8 mm Stahldraht per Hand vorgebohrt werden. Nach der Drahtentfernung erfolgte die standardisierte

Frakturierung (s. o.). Das Einbringen des eigentlichen Implantats erfolgte nach Reposition der Fraktur. Bevor die Wunde verschlossen wurde und eine Röntgenkontrolle durchgeführt werden konnte, musste der überstehende Anteil des Kirschnerdrahtes mit einer Zange an der Austrittsstelle der Kortikalis entfernt werden. Der abschließende Schritt lag in der Wundversorgung mit einem Verband.

### 2.4 Gruppeneinteilung

<b>Gruppe I (Kontrolle):</b>	Implantat unbeschichtet
<b>Gruppe II (PDLLA):</b>	Implantat beschichtet mit Poly(D,L-Laktid)
<b>Gruppe III (WF):</b>	Implantat beschichtet mit Poly(D,L-Laktid) und Insulin like Growth Factor, IGF-I (50µg) und Transforming Growth Factor, TGF-β1 (10µg)

Zeitpunkte der Tötungen: **5,10,15** und **28** Tage post OP

n = 5 pro Gruppe und Zeitpunkt

Insgesamt wurden 60 Tiere immunhistologisch untersucht (n = 60)

### 2.5 Untersuchungen

#### 2.5.1 Material

- Siehe operatives Vorgehen

#### 2.5.2 Geräte

- Siehe operatives Vorgehen

### 2.5.3 Durchführung

Die Untersuchung der Ratten erfolgte sowohl präoperativ (Tag 0), sowie je nach Gruppe an den Tagen 4, 7, 14, 21 bzw. am Tag der Tötung. Dabei wurden die Tiere gewogen, die Temperatur rektal gemessen, Blutbild und Serumparameter erhoben und das rechte Hinterbein in 2 Ebenen geröntgt.

Die Ratte wurde dazu zunächst durch Inhalationsnarkose (O<sub>2</sub>, Lachgas, Isofluran siehe OP) sediert.

Unter der Narkose wurde die Ratte dann gewogen und die Körperkerntemperatur mit einem digitalen Thermometer bestimmt.

Über eine Inhalationsmaske konnte die Anästhesie während der Untersuchung aufrechterhalten werden.

Zur Blutentnahme wurde der retrobulbär gelegene Venenplexus mit einer heparinisierten Glaskapillare punktiert. Entnommen wurden 1,5 ml Blut.

Den Abschluss der Untersuchung bildete die Bildgebung des rechten Beines in 2 Ebenen (posterior – anterior (p.a.) und lateral). Die zweite Aufnahme erfolgte in Bauchlage, mit Abduktion und Außenrotation des operierten Beines. Für die p.a. – Aufnahme wurde das Rattenbein um 90° gedreht. Der Calcaneus stand nun vertikal zur Röntgenplatte. Die Röntgenaufnahmen wurden dann mit einer Strahlenhärte von 55 kV und einer Belichtungszeit von 2,2 mAs vorgenommen, wobei der Abstand zur Platte 60 cm betrug. Für die spätere radiologische Auswertung wurden die jeweilige Veruchsternnummer (Röntgenzahl) sowie ein Aluminium-Phantom mit aufgenommen.

## 2.6 Tötungen und Implantatentfernung

### 2.6.1 Material

- Siehe operatives Vorgehen

### 2.6.2 Geräte

- Siehe operatives Vorgehen

### 2.6.3 Durchführung

Nachdem die Untersuchungen und das Röntgen in 2 Ebenen abgeschlossen wurden, wurden die Tiere am 5., 10., 15. und 28. Tag durch eine intrakardiale Kaliumchlorid – Injektion (1,5 ml KCl) unter Narkose getötet. Zur Präparation wurde die Tibia proximal des oberen Sprunggelenks durchtrennt und im Kniegelenk exartikuliert. Anschließend wurde die Fibula entfernt. Bis zur Einbettung der Tibia in Paraffin verblieb der Kirschnerdraht im Knochen und wurde dann vorsichtig herausgezogen.

## 2.7 Fixierung, Dekalzifizierung, Einbettung und Paraffinschnitte

### 2.7.1 Material

- Fixierlösung

Formol (Formaldehyd) 36% (Merck, Darmstadt, Deutschland), fertige Lösung 10%, Ethylalkohol 100% (Herbeta, Berlin, Deutschland), Barbitol – Natrium – Puffer, pH 7,4 / 0,1 M (Apotheke Charité, Berlin, Deutschland), Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland), Entkalker: 0,36 M EDTA, gepuffert (Herbeta, Berlin, Deutschland)

- Sonstiges

Skalpell, Pinsel, Tissue – Tek, Mega – Cassette (Sakura Finetek, Torrona, USA), Gläser, Paraffin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Objektträger

### 2.7.2 Geräte

Einbettungsmaschine (Leica, Solms, Deutschland), Mikrotom (Leica, Solms, Deutschland), Rüttler (Karl Knecht GmbH, Sondheim, Deutschland)

### 2.7.3 Durchführung

Nach der Explantation der Tibia erfolgte die unmittelbare Fixierung in Formaldehyd. Das Präparat wurde dazu in ein Gewebekästchen platziert und 2 Tage bei Raumtemperatur (RT) in der Fixierlösung belassen. Anschließend

erfolgte die 14 – tägige Dekalzifizierung der Tibia in EDTA, um die mineralischen Bestandteile des Knochens zu entfernen. Im Folgenden wurde das Präparat achsengerecht in Paraffin eingebettet, so dass der Margo anterior senkrecht zur Schnittfläche stand. So war eine präzise Schnittführung in der Frontal – Ebene gewährleistet. Schließlich wurden in der Frontalebene mit dem Mikrotom 5 µm dicke Serienschnitte der Tibia angefertigt. Bevor die Präparate immunhistologisch untersucht werden konnten, wurden sie auf den Objektträger aufgebracht, mit fortlaufender Nummer versehen und schließlich im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

## **2.8 Histologie**

### **2.8.1 Material**

#### **Histologische Färbung**

- Safranin-O: 1 g in 100 ml Aqua dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland; 1382);
- Lichtgrün: 1 g Lichtgrün in 1000 ml Aqua dest. und Zugabe von 2 ml Essigsäure (Chroma 1B211)

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschliessend für 8-10 Minuten in die Safranin-O Lösung getaucht. Anschliessend erfolgte die dreimalige Spülung in Aqua dest. Nach der 10 minütigen Inkubation in Pikrinsäure erfolgte die erneute Spülung mit Aqua dest. und das Abspülen mit 1% Essigsäure. Es folgte nun die Gegenfärbung mit Lichtgrün für 8-10 Minuten. Nach erneuter Spülung mit 1% Essigsäure wurden die Präparate in 100% Alkohol und abschliessend für 2x5 Minuten in Xylol getaucht. Danach erfolgte das Eindeckeln.

## 2.9 Immunhistologie

### 2.9.1 Material

#### Immunhistologische Färbung

- Tris – HCL – Puffer (TBS), pH 8,2 (5 L):  
Sigma Trizma HCLT 33g (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Sigma Trizma Base 4,5 g (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), NaCl 43,9 g, NaOH (2N) 35ml
- Primärantikörper  
Monoklonal Mouse anti CD 68 (Klon ED1) (BM4000, 1:2000, DPC, Biermann, Bad Nauheim, Deutschland)
- Sekundärantikörper  
Horse anti – Mouse, rat – adsorbed, (biotinyliert) (Vector, Burlingame, USA)
- ABC-Kit  
Vecastain – ABC – AP – Standard – Kit (Vector, Burlingame, USA) ,  
Blockingsolution (Normalserum): Horse, ABC – Solution: a) Reagenz A, b) Reagenz B
- Neu – Fuchsin (Alkaline Phosphatase), Substrat Kit I, SK – 5100 (Vector, Burlingame, USA)
- Verdünnungspuffer für Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- PBS – Puffer

#### Kerngegenfärbung

- Methylgrün (Merck, Darmstadt, Deutschland)

#### Sonstiges

Aqua dest., Verdünnungsreihe Xylol – Alkohol: Xylol 100%: 100 % Alkohol, 96, % Alkohol, 80 % Alkohol, 70 % Alkohol, Erlenmeyerkolben, 5l, Glasgefäße, Objekträger – Schiffchen, Eppendorf – Pipetten: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Pipettenspitzen (blau, gelb, kristall), Eppendorf – Caps (1,5 ml), Reagenz – Röhren (10 ml), Feuchtkammer, Kleenex, Pinzette, Edding (schwarz),

Fettstift, Parafilm M (American National Can, Chicago, USA), Alufolie, Deckgläschen, 24 x 60 (Menzel, Braunschweig, Deutschland), Eindeckelmedium Vitro.Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland), Glasstab

### 2.9.2 Geräte

pH – Meter pH 320 (WTW, Weilheim, Deutschland), Geeichte Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland), Mixer (Heidolph, Schwabach, Deutschland), Rüttler (Karl Knecht GmbH, Sondheim, Deutschland), Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), Abzug, Trockenschrank, Kühlschrank

### 2.9.3 Durchführung

#### Herstellen der Gebrauchslösungen

➤ Puffer:

- Tris – HCL – Puffer (0,1 M Tris – Hydroxymethyl – Aminomethan, HCL, 0,15 M NaCl, pH 8,2)

➤ Normalserum:

- 1 ml Verdünnungspuffer
- 10 µl Normalserum
- mischen

➤ Primärantikörper:

- 2 ml Verdünnungspuffer
- 1 µl Primärantikörper
- mischen

➤ Biotinylierter Sekundärantikörper:

- 1 ml Verdünnungspuffer
- 20 µl biotinylierter Sekundärantikörper
- 20 µl Normalserum



## Material & Methoden

---

- 8) 60 Minuten Inkubation mit ABC – AP – Komplex bei Raumtemperatur
- 9) 1 x Spülen mit Puffer (PBS)
- 10) 1x Spülen mit Tris – Puffer
- 11) 5 – 10 Minuten Inkubation mit Neu – Fuchsin, bei visueller Kontrolle unter unter dem Mikroskop
- 12) 2 x Spülen mit Puffer (PBS)
- 13) 30 Sekunden Kern – Gegenfärbung mit Methylgrün
- 14) 3 x Spülen in Aqua dest.
- 15) Schnitte dehydrieren:
  - 70 % Alkohol                      2 min
  - 2 x 100 % Alkohol                je 2 min
  - 2 x Xylol
- 16) Eindeckeln unter dem Abzug

### 2.10 TRAP

#### 2.10.1 Material

##### TRAP-Färbung

- TRAP – Puffer, pH 5,0:

3,28 g Natrium Acetat (0,04 M) (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 2,3 g Natriumtartrat (0,1 M) (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 1 l Aqua dest. und pH Einstellung mittels HCL auf pH 5
- TRAP – Reaktionslösung:

40 mg Naphtol-AS-Mix Phosphat (0,01%) (Sigma, Steinheim, Deutschland, Cat. 5000) + 240 mg Fast Red Violett LB Salt (0,06%) (Sigma, Steinheim, Deutschland, Cat. F3381) + 4 ml N-N Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 2 ml Triton X (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Kerngegenfärbung

Methylgrün (Merck, Darmstadt, Deutschland)



## Material & Methoden

---

- 6) Spülen in Leitungswasser
- 7) 30 Sekunden Kern – Gegenfärbung mit Methylgrün
- 8) 3 x Spülen in Aqua dest.
- 9) Schnitte dehydrieren:
  - 70 % Alkohol            2 min
  - 2 x 100 % Alkohol    je 2 min
- 10) 2 x Xylol
- 11) Eindeckeln unter dem Abzug

### 2.11 Auswertung

#### 2.11.1 Geräte

Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), Software (Bildanalyzesystem Zeiss KS400, Jena, Deutschland)

Die Auswertung der Immunreaktivität des ED1 Antikörpers bzw. der Aktivität der TRAP-Färbung erfolgte mittels Bildanalyse. Hierbei wurde eine prozentuale Berechnung der angefärbten Fläche im Verhältnis zur ungefärbten Fläche durchgeführt. Hierzu wurde zuvor eine region of interest (ROI) wie folgt definiert (Abb. 6):

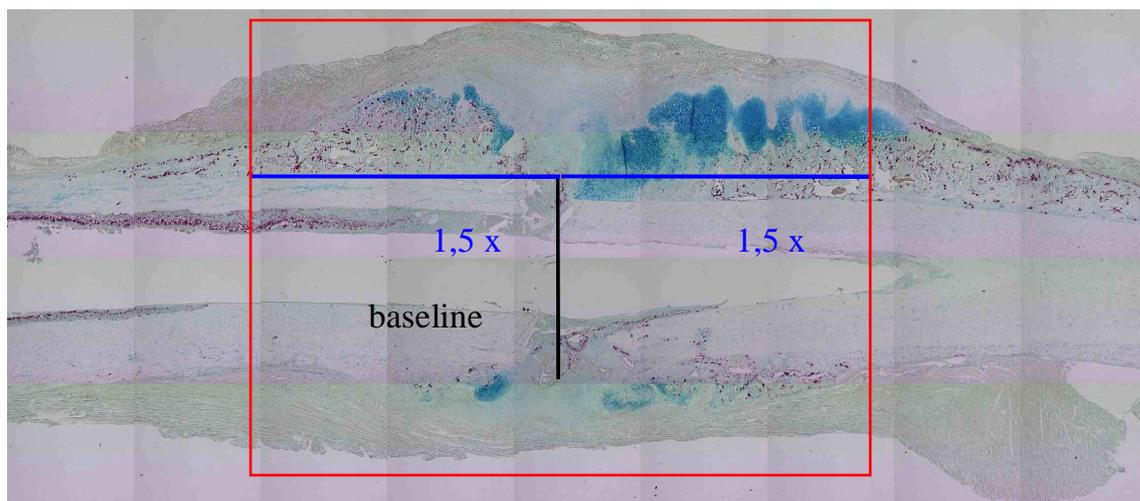


Abb. 6: Region of interest (ROI) (rote Begrenzung)

Ausgehend vom, in Höhe des Frakturspaltes verlaufenden, Kortikalisdurchmesser (sog. Baseline) wurde diese Strecke mit 1,5 multipliziert und nach proximal und distal vermessen. Zunächst wurde die Fläche des proximalen medialen und lateralen Periost ausgemessen und schließlich mit der Fläche des distalen medialen und lateralen Periost addiert. Anschließend wurde nun die gefärbte Fläche (ED1 bzw. TRAP Aktivität) ins Verhältnis zur gesamten Fläche gesetzt. Somit erhielt man eine prozentuale Berechnung der gefärbten Fläche pro Region. Analog bestimmte man diese Fläche im Bereich des Endosts nach Definition und Addition des proximalen und distalen Endosts.

### **2.11.2 Statistik**

Für die erhobenen Daten wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Anschließend wurden diese errechneten Werte anhand der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA für unabhängige Stichproben statistisch ausgewertet. Als Kontrolle wurde ein Post-Hoc-Test nach Bonferroni durchgeführt, bei dem die Gruppen eines jeweiligen Zeitpunktes miteinander verglichen wurden. Die statistischen Signifikanzen wurden im 95% Konfidenz-Intervall ausgedrückt. Die Berechnung der statistischen Daten erfolgte mit der Software SPSS (Version 10.0; Inc. Chicago, Illinois).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Klinischer Verlauf und Laborparameter**

Die Operation wurde von den Tieren im Allgemeinen gut toleriert. Sie konnten innerhalb der ersten postoperativen Woche nach Abklingen des Wundschmerzes die operierte Extremität voll belasten. Lokale oder systemische Infektionen konnten bei keinem der Tiere nachgewiesen werden.

Die im Verlauf durchgeführten radiologischen Kontrollen ergaben keinen Hinweis auf Osteolysen bzw. septische Lockerungszeichen des implantierten intramedullären Kraftträgers. Auch die Untersuchungen der Blut- und Serumparameter zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

#### **3.2 Ergebnisse im Verlauf (Histologie, Immunhistologie, TRAP)**

Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand ausgewählter Präparate vorgestellt. Dabei werden zu jedem Zeitpunkt (5, 10, 15, 28 Tage) zunächst die histologischen, dann die immunhistologischen und schließlich die histochemischen Präparate beschrieben. Die immunhistologische Untersuchung wurde mit dem Ratten-Makrophagen Marker ED1 durchgeführt. Für die histochemische Färbung wurde die sog. tartrat resistente Saure Phosphatase (TRAP) verwendet .

##### **3.2.1 5 Tage nach Operation**

###### **3.2.1.1 Histologie:**

Der Kallus (Ka) wurde 5 Tage post operationem in allen drei Gruppen überwiegend von Bindegewebszellen, sog. Fibroblasten, gebildet. Diese waren nahe des Frakturspaltes (Fx), wie auch periostal entlang der diaphysären Kortikalis (Ko) lokalisiert (Abb. 7a-c). Die mit PDLLA (Abb. 7b) und mit den Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF  $\beta$  1 (Abb. 7c) beschichteten Gruppen wiesen dabei eine stärkere Kallusbildung auf, als die Kontrollgruppe (Abb. 7a). In der mit IGF-I und TGF- $\beta$  1 behandelten Gruppe zeigten sich darüber hinaus

## Ergebnisse

---

bereits zu diesem Zeitpunkt einzelne Chondrozyteninseln, die die beginnende Chondrogenese charakterisierten. Diese Knorpelzellen liessen sich in der Kontrollgruppe nicht und in der PDLLA-Gruppe nur in geringerem Ausmaß nachweisen. In den frakturspaltfernen Bereichen des Kallus war in allen drei Gruppen bereits trabekulärer Knochen gebildet worden.

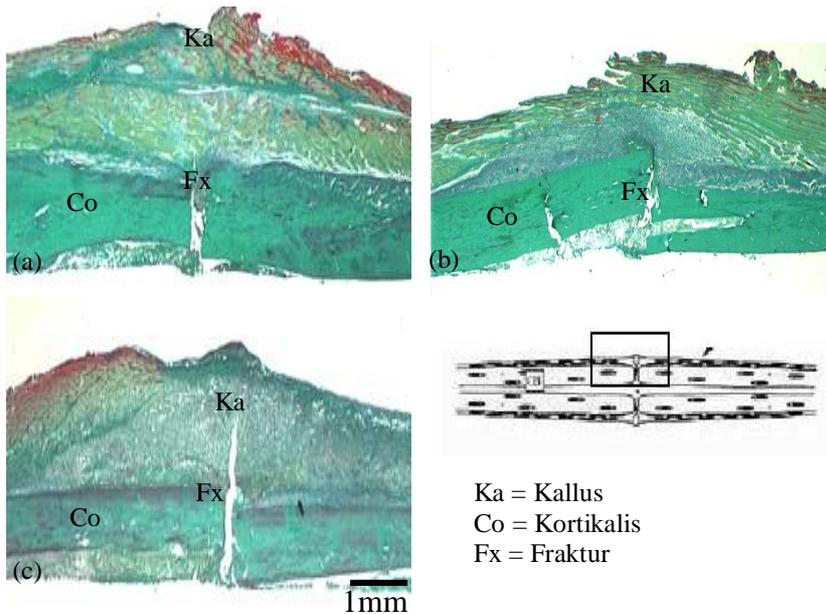


Abb. 7(a-c): 1,6er Objektiv; Maßstabsbalken: 1mm; In allen drei Gruppen lässt sich am 5. postoperativen Tag bindegewebiger Kallus nachweisen. In der mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppe (c) lassen sich darüber hinaus bereits vereinzelt Chondrozyten nachweisen. Diese sind in der Kontrollgruppe (a) und PDLLA-Gruppe (b) nicht nachweisbar.

### 3.2.1.2 Immunhistologie:

Am 5. postoperativen Tag fanden sich in allen drei Gruppen ED1 positive Zellen. Die deutliche Immunreaktivität zeigte sich sowohl im Periost (Abb. 8 a-c) als auch im proximalen Endost (Abb. 9a-c). Während die Zellen im periostalen Kallus proximal und distal in enger Nachbarschaft zum Frakturspalt anzutreffen waren, lagen sie endostal in einiger Entfernung zu diesem und fast ausschließlich proximal der Frakturzone. Morphologisch handelte es sich überwiegend um mononukleäre Zellen mit unterschiedlicher Form. Neben

## Ergebnisse

---

langezogenen, spindelförmigen Zellen fand man solche mit eher rundlichem Aufbau. In der Kontrollgruppe lagerten sie sich im Periost zum Teil inselförmig zusammen. Durch die Fusion mehrerer einkerniger Zellen kam es zur Bildung mehrkerniger Riesenzellen (Abb. 8d). Dieses Phänomen liess sich in der PDLLA – Gruppe (Abb. 8b) und Wachstumsfaktorengruppe (Abb. 8c) periostal nicht beobachten. In beiden beschichteten Gruppen (PDLLA / PDLLA + Wachstumsfaktoren) lagen hier die ED1 – positiven Zelle überwiegend einkernig vor.

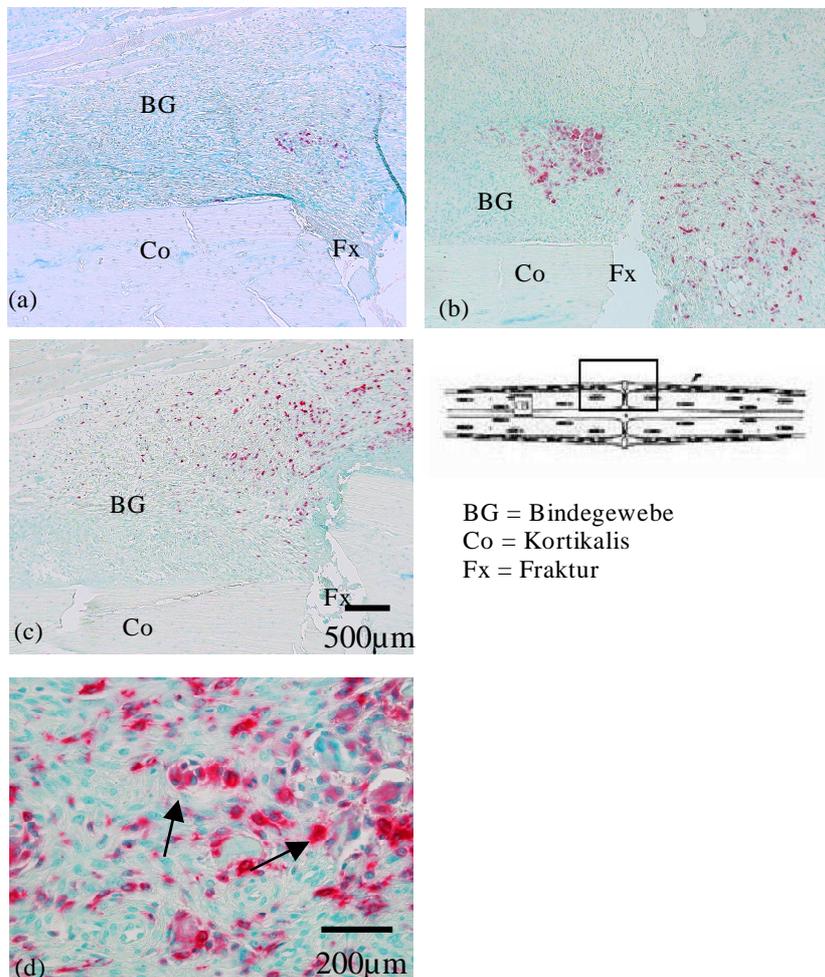


Abb. 8 (a-d): (a-c) 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500µm; (d) 20er Objektiv; Maßstabsbalken: 200µm): 5 Tage postoperativ zeigen sich in allen drei Gruppen (a-Kontrollgruppe; b-PDLLA-Gruppe; c-Wachstumsfaktorengruppe) überwiegend mononukleäre, inselförmig liegende Zellen. In der Vergrößerung (d) erkennt man deutlich die unterschiedliche Zellmorphologie. Während die einkernigen Zellen eher eine längliche Form aufweisen, haben die mehrkernigen Zellen einen rundlichen Charakter (→).

## Ergebnisse

---

Auch im Endost waren in allen drei Gruppen nach 5 Tagen immunpositive Zellen nachweisbar (Abb. 9a-c). Diese lagen überwiegend proximal des Frakturspaltes.

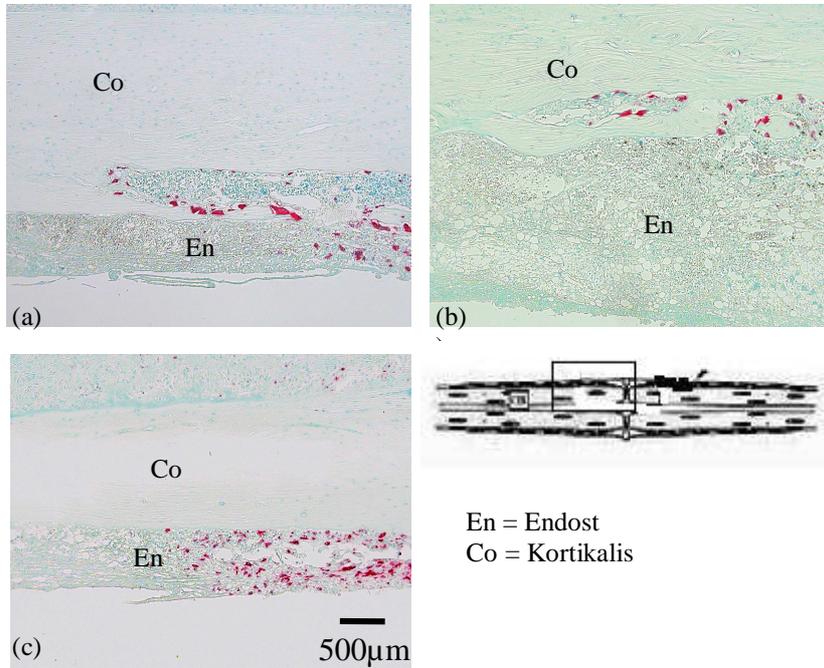


Abb. 9(a-c): 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500μm: Die hier dargestellten Präparate sind Ausschnitte des proximalen, frakturnahen Endost (En). Die Fraktur liegt hierbei am rechten Bildrand. Auffällig ist die Anordnung der Zellen an die angrenzende Kortikalis (Co), sowohl in der Kontrollgruppe (a), der PDLLA-Gruppe (b), wie auch in der Wachstumsfaktorengruppe (c).

### 3.2.1.3 TRAP:

Zu diesem frühen Zeitpunkt zeigten sich in keiner der drei Gruppen TRAP – positive Zellen im Bereich des periostalen Kallus.(Abb. 10a-c).

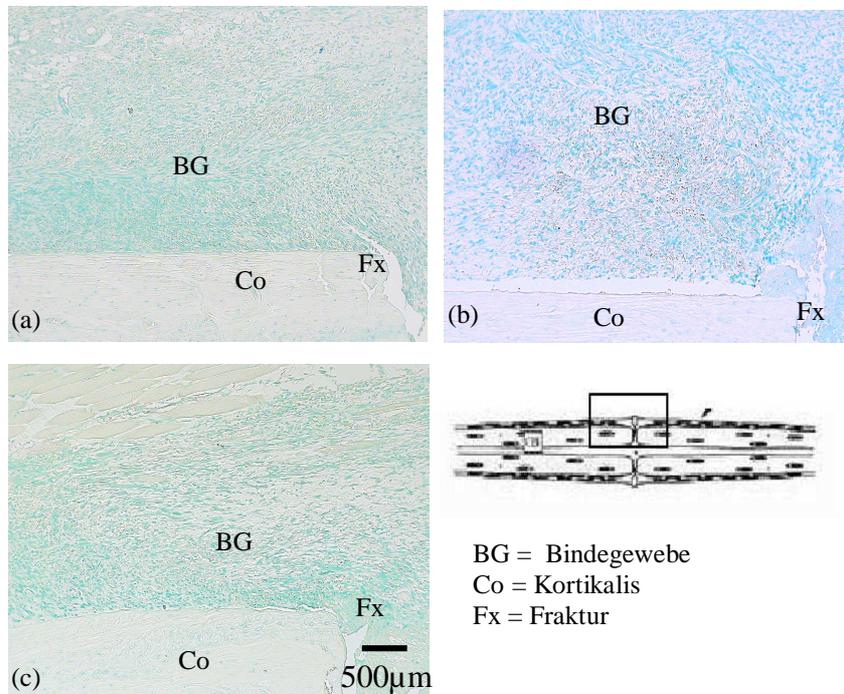


Abb. 10(a-c): 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500µm: Es ist lediglich lockeres Bindegewebe (BG) im periostalen Kallus nachweisbar. TRAP positive Zellen lassen sich in unmittelbarer Nähe zum Frakturspalt (Fx) weder in der Kontrollgruppe (a), der PDLLA-Gruppe (b), noch in der Wachstumsfaktorengruppe (c) nachweisen.

## Ergebnisse

Auch im Endost sah man keine TRAP positiven Zellen.

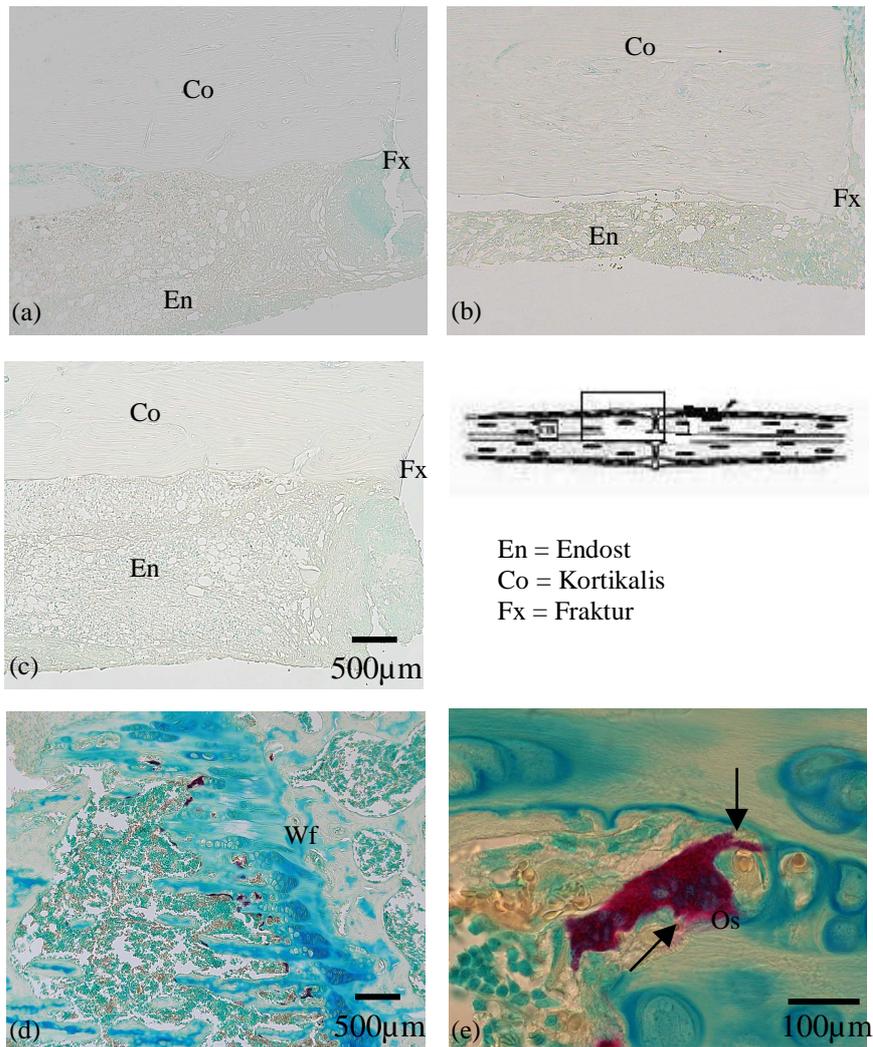


Abb. 11(a-e): (a-d) 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500µm; (e) 40er Objektiv; Maßstabsbalken: 100µm: Auf den hier abgebildeten Präparaten (a-c) sieht man am rechten Bildrand den Frakturspalt (Fx). Links davon die proximale Kortikalis (Co) mit an den Markraum grenzenden Endost (En). Auch hier lassen sich in keiner der Gruppen (a-Kontrollgruppe; b-PDLLA-Gruppe; c-Wachstumsfaktorengruppe) angefärbte Zellen nachweisen. Weiter proximal (d), im Bereich der Wachstumsfuge (Wf), lassen sich jedoch in allen Gruppen gefärbte Zellen nachweisen. In der Vergrößerung im Bereich der Wachstumsfuge (e) sieht man, dass sich diese überwiegend mehrkernigen Zellen mit ihren ausgezogenen Zytoplasmaausläufern (→) dem neugebildeten Osteoid (Os) anlagern.

### 3.2.2 10 Tage nach Operation

#### 3.2.2.1 Histologie:

Nach 10 Tagen fand sich in allen drei Gruppen eine starke Frakturkallusbildung mit Bindegewebe (BG), chondralem Gewebe (Kn) und Geflechtknochen (Gf) (Abb. 12a-c). Im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt hatte der Kallus deutlich an Volumen zugenommen. Er konnte nun in eine harte und eine weiche Komponente unterteilt werden. Die Verteilung der einzelnen Gewebe ergab sich dabei wie folgt:

Im Bereich des Frakturspaltes fand sich überwiegend Bindegewebe. Proximal und distal davon schlossen sich knorpelige Bereiche an. Diese beiden Bezirke bildeten den weichen Kallus. In Richtung Metaphysen ging dieser in den sog. harten Kallus über, der durch trabekulär angeordneten Geflechtknochen charakterisiert war. Alle untersuchten Gruppen befanden sich in der Phase der Chondrogenese mit teilweiseem Übergang in die enchondrale Ossifikation. Diese war gekennzeichnet durch den Umbau des Knorpelgerüsts (Kn) in Geflechtknochen (Gf). Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

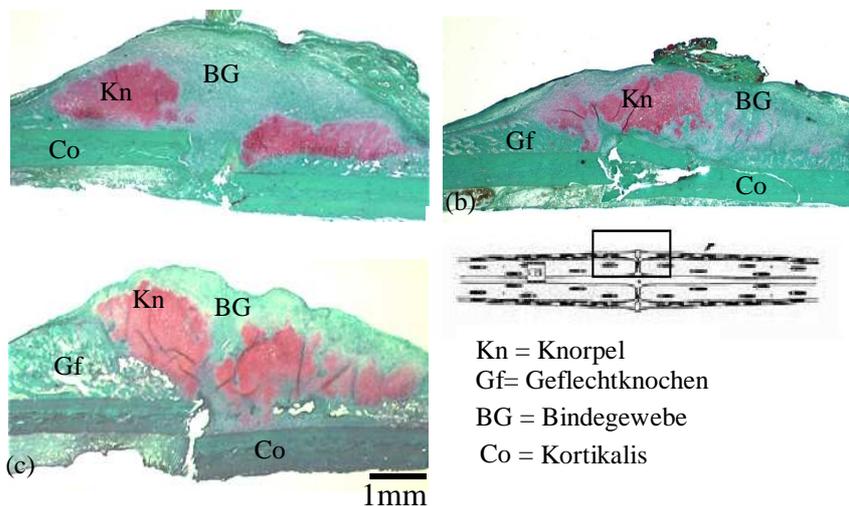


Abb. 12(a-c): 1,6er Objektiv, Maßstabsbalken: 1mm: In allen drei Gruppen hat das Volumen des Kallus deutlich zugenommen. Dieser besteht vor allem in der mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppe (c) aus neugebildetem Knorpel. In der Kontrollgruppe (a) und der PDLLA-Gruppe (b) ist deutlich weniger Knorpel nachweisbar.

### 3.2.2.2 Immunhistologie:

Im Periost (Abb. 13a-c) war 10 Tage nach der Fraktur in allen Gruppen eine Immunreaktivität festzustellen. Diese war in der Kontrollgruppe am stärksten ausgeprägt. Die meisten ED1 positiven Zellen wiesen in allen drei Gruppen mehrere Kerne auf.

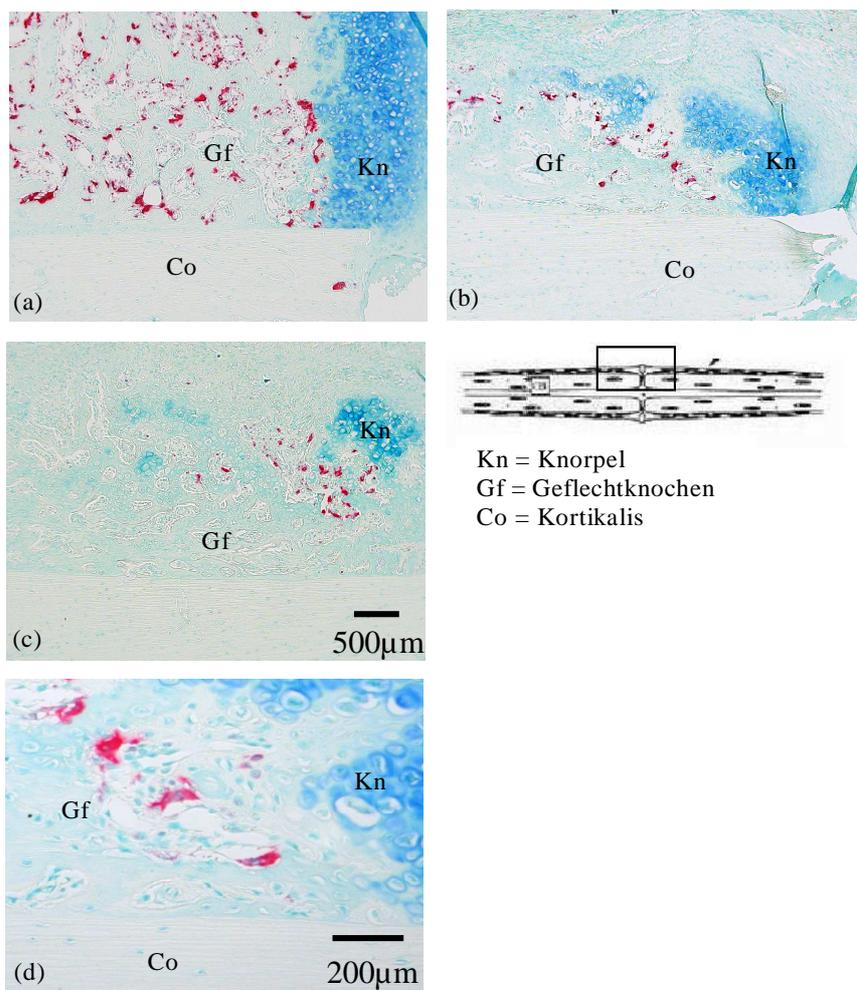


Abb. 13(a-d): (a-c) 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500µm; (d): 20er Objektiv; Maßstabsbalken: 200µm: In allen drei Gruppen liegen ED1 positive Zellen im periostalen Kallus vor. Diese überwiegen in der Kontrollgruppe (a). Sie treten entlang des vorgefertigten Knorpelgerüsts (Kn) und der bereits gebildeten trabekulären Knochenbälkchen des Geflechtknochens (Gf) auf. Die Ossifikation ist in der PDLLA-(b) und Wachstumsfaktorengruppe (c) bereits deutlich fortgeschritten, während in der Kontrollgruppe (a) noch ein großer Knorpelanteil nachweisbar ist. In der Vergrößerung (d) weisen die mehrkernigen Zellen Zytoplasmaausläufer auf und liegen im harten Kallus dem trabekulären Geflechtknochen (Gf) an.

## Ergebnisse

---

Im Endost liessen sich ebenfalls in allen drei Gruppen ED1 positive Zellen nachweisen (Abb. 14a-c). Diese lagen wie schon 5 Tage nach Fraktur fast ausschliesslich im proximalen Anteil.

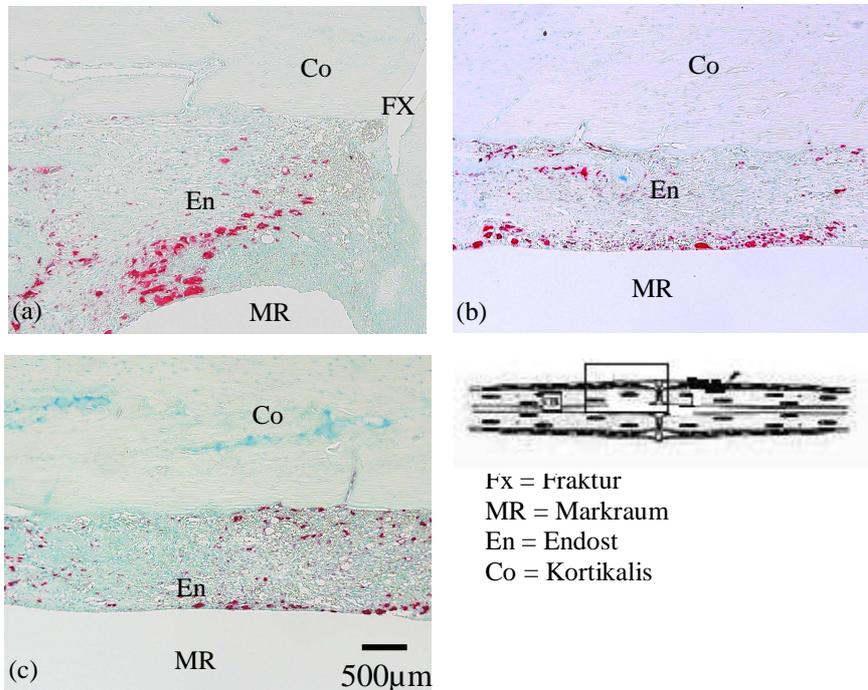


Abb. 14(a-c): 2,5er Objektiv; Maßstabsbalken: 500µm: Auch endostal (En) lassen sich in allen drei Gruppen ED1 positive Zellen nachweisen. Diese liegen wie schon zum vorherigen Zeitpunkt überwiegend proximal des Frakturspaltens und sind vor allem in der innersten, der Markraum (MR) zugewandten Seite, lokalisiert. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (a), PDLLA-Gruppe (b) und Wachstumsfaktorengruppe (c) lassen sich nicht beobachten.

### 3.2.2.3 TRAP:

Am zweiten Untersuchungszeitpunkt, 10 Tage nach der Operation, liessen sich in allen drei Gruppen sowohl periostal (Abb. 15a-c) wie auch endostal (Abb. 16a-c) TRAP – positive Zellen nachweisen. Dabei lag der Häufigkeitsgipfel in der Kontrollgruppe (a). Periostal liegen die Zellen im Bereich des neugebildeten trabekulären Knochengeflechts. Das Knorpelgerüst, bestehend aus Chondrozyten und Matrix war in allen drei Gruppen stark ausgeprägt. Hier liess sich keine TRAP-Aktivität nachweisen.