

Aus dem Centrum für muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
und dem Julius Wolff Institut der Charité

DISSERTATION

**Langzeitwirkung der lokalen Applikation von IGF-I und
TGF- β 1 auf die Frakturheilung – Eine biomechanische und
histomorphologische Untersuchung am Rattenmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Michael Ostapowicz

aus Singen am Hohentwiel

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. G. Schmidmaier
 2.: Prof. Dr. A. Nüssler
 3.: Prof. Dr. med. V. Ewerbeck

Datum der Promotion: 03.09.2010

1 EINLEITUNG 5

1.1	Überblick	5
1.2	Die reguläre Frakturheilung	7
1.3	Zusammensetzung des Knochens	10
1.4	Wachstumsfaktoren	11
1.4.1	Transforming growth factor beta	11
1.4.2	Insulin-like growth factor	12
1.4.3	Weitere Wachstumsfaktoren	13
1.5	Wachstumsfaktoren und Knochenheilung	15
1.6	Ziele dieser Arbeit	18
1.6.1	Hypothese dieser Arbeit	18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1	Implantate und Beschichtung	19
2.1.1	Implantate	19
2.1.2	Wachstumsfaktoren	19
2.1.3	Trägermaterial	19
2.1.4	Beschichtungsverfahren	19
2.2	Versuchstiere	20
2.3	Gruppeneinteilung	20
2.4	Operatives Vorgehen	21
2.4.1	Narkose und Vorbehandlung	21
2.4.2	Fraktur	22
2.4.3	Stabilisierung	23
2.5	Untersuchungen	24
2.6	Tötung und Präparation	26
2.6.1	Tötung	26
2.6.2	Präparation	26
2.7	Biomechanische Testung	27
2.7.1	Einbettung	27
2.7.2	Messung	28
2.7.3	Bearbeitung der Daten	29
2.8	Knochenaufbereitung für die Histomorphologie/-morphometrie	31
2.8.1	Fixation	31
2.8.2	Dehydration und Entfettung	31
2.8.3	Einbettung	32
2.9	Herstellen der histologischen Schnitte	33
2.9.1	Schleifen	33
2.9.2	Objektträgerbeschichtung	33
2.9.3	Schneiden	33
2.10	Färben der histologischen Schnitte	35
2.10.1	Allgemeines und Vorbehandlung	35
2.10.2	Versilberung nach von Kossa	35

2.10.3	Safranin O/Lichtgrün-Färbung	37
2.11	Histomorphologische/-morphometrische Analyse	38
2.12	Auswertung der radiologischen Kontrollen	42
2.13	Statistik	42
	3 ERGEBNISSE	43
3.1	Ausfälle	43
3.2	Gewicht und Temperatur	44
3.3	Radiologische Untersuchung	45
3.3.1	Verlauf	45
3.3.2	Radiologische Auswertung	46
3.4	Biomechanische Testung	49
3.5	Histomorphologische und histomorphometrische Analyse	53
3.6	Untersuchungen früherer Zeitpunkte	59
	4 DISKUSSION	63
	5 ZUSAMMENFASSUNG	71
	6 VERZEICHNISSE	73
6.1	Literaturverzeichnis	73
6.2	Abbildungsverzeichnis	80
6.3	Tabellenverzeichnis	82
	7 ANHANG	83
7.1	Danksagung	83
7.2	Curriculum vitae	84
7.3	Erklärung an Eides statt	85
7.4	Publikationsliste	86
7.5	Abkürzungsverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Überblick

Ziel der Orthopädie und Unfallchirurgie ist eine schnelle Wiederherstellung der muskuloskeletalen Funktionalität einhergehend mit einer guten Knochenregeneration und Vermeidung von Komplikationen. Infektionen, verzögerte oder in schlechter Position heilende Knochen bis hin zur Pseudarthrose sind relevante Komplikationsmöglichkeiten. Epidemiologisch spielt die Alterstraumatologie eine immer größere Rolle, so dass die zügige, komplikationsfreie Frakturheilung auch zur Vermeidung einer Pflegebedürftigkeit immer wichtiger wird [Lohmann R et al. 2007].

Um Komplikationen gering zu halten werden verschiedene Behandlungsmethoden mit ihren Vor- und Nachteilen entwickelt, verfeinert und miteinander verglichen. Tibiaschaftfrakturen werden zum Beispiel entweder konservativ durch Ruhigstellung im Cast oder operativ mit einer Platte oder einem Nagel osteosynthetisch versorgt. Die Ruhigstellung bietet den Vorteil seltener auftretender Infektionen im Vergleich zur operativen Therapie. Allerdings ist bei der Osteosynthese mit einer Platte sowohl die Rate an verzögerter Knochenheilung und Pseudarthrosenbildung als auch die Gesamtrate an Komplikationen niedriger [Coles CP et al. 2000]. Trotzdem muss natürlich in jedem Einzelfall neu entschieden werden. Neben der mechanisch optimalen Versorgung stellt die biologische Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine weitere Möglichkeit der Heilungsförderung dar.

Seit der Entdeckung von Marshall Urist im Jahre 1965, dass demineralisierter Knochen ektop die Bildung von Knochen induzieren kann [Urist MR et al. 1965], wofür Wachstumsfaktoren (WF) verantwortlich sind, hat die Forschung auf diesem Gebiet sehr stark zugenommen. Zahlreiche Studien *in vitro* als auch *in vivo* haben die Auswirkungen und den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Knochenstoffwechsel insbesondere auf die Frakturheilung untersucht. Die Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-7 sind bereits im klinischen Einsatz zur Stimulation der Frakturheilung und Behandlung von Pseudarthrosen.

[Andreassen TT et al. 1995], [Isgaard J et al. 1986], [Kassem M et al. 1994], [Lamberg A et al. 2006], [Lind M et al. 1993], [Nakamura K et al. 1996], [Pfeilschifter J et al. 1990], [Rosier RN et al. 1998], [Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P et al. 2006], [Schumacher B et al. 1996], [Solheim E 1998].

Um den Effekt von Wachstumsfaktoren zu erhöhen und das Risiko von unerwünschten Wirkungen zu reduzieren, wird an Techniken gearbeitet, WF von beschichteten osteosynthetischen Implantaten lokal und kontrolliert zu applizieren.

Für die Wachstumsfaktoren Insulin like growth factor-I (IGF-I) und Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) wurde hierbei ein beschleunigender Effekt auf die Frakturheilung und den Knochenstoffwechsel in mehreren Tiermodellen klar demonstriert [Beck L et al. 1993], [Blumenfeld I et al. 2002], [Spencer EM et al. 1991], [Thaller SR, Dart A et al. 1993]. Untersuchungen zeigten einen positiven Effekt von lokal applizierten WF bei der Frakturheilung am Rattenmodell zum Zeitpunkt 4 und 6 Wochen postoperativ [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001], [Schmidmaier G, Wildemann B, Lucke M et al. 2001], [Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T et al. 2003].

Neben dem Nachweis der Stimulierbarkeit der Frakturheilung durch Wachstumsfaktoren stellt sich die Frage nach möglichen Langzeitwirkungen auf das Knochengewebe.

Ziel dieser Untersuchung war daher die physiologische Frakturheilung im Langzeitversuch (12 Wochen) zu verfolgen und mit der Stimulation durch lokal applizierte Wachstumsfaktoren über eine etablierte biodegradierbare Beschichtung zu vergleichen.

1.2 Die reguläre Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplizierter Prozess, der von vielen Faktoren beeinflusst wird. Klassischerweise wird die Frakturheilung in die primäre Frakturheilung und in die sekundäre Frakturheilung unterteilt. Die primäre Frakturheilung oder die primär kortikale Heilung tritt auf, wenn der distale und der proximale Teil des frakturierten Knochens beziehungsweise der Kortikalis sich direkt miteinander verbinden. Es kommt zu einer direkten Überbrückung des Defekts ohne eine Kallusformation. Ähnlich wie im normalen Knochenumbau resorbieren Osteoklasten überschüssiges und nekrotisches Knochengewebe. Diese auch desmale Ossifikation genannte Heilung findet nur statt, wenn die Knochenenden optimal anatomisch adaptiert sind und bei mechanisch absolut stabil miteinander verankerten Frakturenenden. Diese Bedingungen treten bei sehr kleinen Knochendefekten und schmalen Frakturspalten auf oder bei sehr stabiler osteosynthetischer Frakturversorgung [Einhorn TA 1998].

Die sekundäre Frakturheilung tritt auf, wenn die Bedingungen für eine primäre Frakturheilung nicht gegeben sind. Sie kann in mehrere Phasen unterteilt werden, die zeitlich zueinander geordnet sind. Die Phasen der sekundären Frakturheilung können aber nicht scharf voneinander abgegrenzt werden, da sie sich gegenseitig beeinflussen und überlappend ineinander übergehen [Barnes GL et al. 1999] (Siehe Abbildung 1).

- Verletzungs-/Frakturphase (I)
- Entzündungs- und Granulationsphase (II)
- Desmale Ossifikation (III)
- Chondrogenese (IV)
- Enchondrale Ossifikation (V)
- Modeling und Remodeling (Phase des Umbaus) (VI)

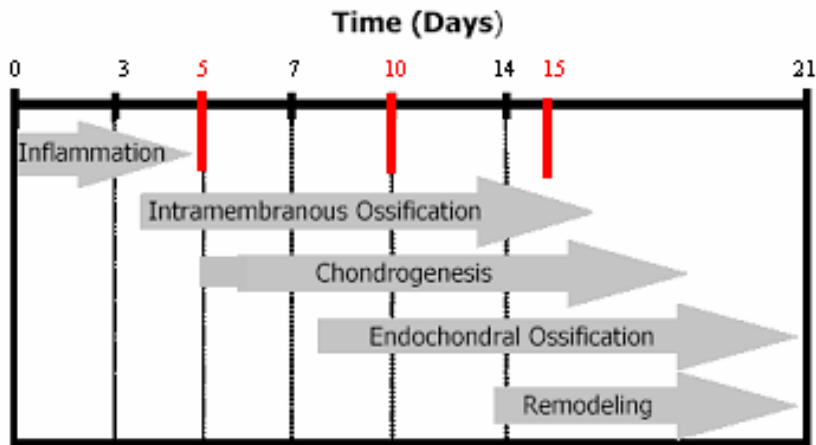


Abbildung 1: Die Zeitachse demonstriert die verschiedenen sich zeitlich überlappenden Phasen der komplexen Frakturheilung. Die Frakturphase entspricht dem Tag 0. Die Pfeile zeigen annähernd den Beginn und die Dauer der Phasen, die am Rattenmodell untersucht worden sind. Abbildung nach Hadjiargyrou et al. 2002.

I) In der **Verletzungs- bzw. Frakturphase** wird der Knochen und das umliegende Weichteilgewebe wie z.B. Muskeln, Bänder, Sehnen, Nerven und Gefäße verletzt. Durch die Verletzung der vaskulären Strukturen ist die Nährstoff- und Sauerstoffabgabe gestört. Es bildet sich ein Hämatom, was zur Folge hat, dass es zu einer Infiltration mit Entzündungszellen, Makrophagen, pluripotenten Stammzellen und degranulierenden Thrombozyten kommt.

II) In der **Entzündungs- und Granulationsphase** werden zahlreiche Zytokine (z.B. Interleukine 1 u. 6) und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , PDGF) in den Bruchspalt ausgeschüttet, die wichtig für die Zellsteuerung, Zellinfiltration (Chemotaxis), Zelldifferenzierung und Angiogenese sind. Es kommt zur Ausbildung von Granulationsgewebe bestehend aus Fibroblasten, Osteoblasten, Kapillaren und Kollagen, welches beginnt das Hämatom zu ersetzen. Unter anderem sind folgende WF beteiligt [Linkhart TA et al. 1996], [Trippel S et al. 1996]:

- Bone morphogenetic proteins (BMPs)
- Bone derived growth factor (β_2 -Mikroglobulin)
- Fibroblast growth factor (FGF)
- Insulin-like growth factor (IGF)
- Platelet derived growth factor (PDGF)
- Transforming growth factor beta (TGF- β)

III) Bei der Frakturheilung spielt das Periost mit Mesenchymzellen und Vorläuferzellen der Osteoblasten, die die Kortexoberfläche säumen, eine wichtige Rolle. Die Osteoblasten an der Kortexoberfläche werden aktiviert und an das Periost angrenzende Osteoprogenitorzellen teilen und differenzieren sich. Die ansässigen und differenzierten Osteoblasten bilden neuen Knochen über den Weg der **desmalen Ossifikation** am Frakturspalt. Dieser dabei entstehende Geflechtknochen wird „harter“ Kallus genannt.

IV) Mesenchymzellen (u.a. aus dem Periost), die schon in der frühen Phase der Frakturheilung nachgewiesen werden können, proliferieren im Frakturspalt und differenzieren sich zu Chondrozyten oder Osteoblasten [Lee FY et al. 1998]. Diese bei der **Chondrogenese** neu entstandenen Chondrozyten ersetzen das Hämatom und bilden einen knorpeligen Kallus, der die Frakturrenden miteinander verbindet. Zusammen mit dem Bindegewebe wird der Kallus mit den knorpeligen Anteilen „weicher“ Kallus genannt. Der harte und weiche Kallus sorgen für die initiale Stabilität.

V) Im Übergangsbereich des weichen Kallus zum Geflechtknochen des harten Kallus beginnt die **enchondrale Ossifikation**, die die Kallushärtung einleitet. Die Chondrozyten hypertrophieren und bilden Vesikel, die in die extrazelluläre Matrix migrieren. Diese Vesikel enthalten Enzyme, die die Matrix proteolytisch zersetzen. Außerdem nehmen sie an der Kalziumregulation teil. Beides sind wichtige Funktionen bei der Kalzifizierung des weichen Kallus. Dieser Prozess lässt sich in beinahe identischer Art und Weise in der Wachstumsfuge beobachten. Nach der Kalzifizierung des Knorpels wachsen Gefäße ein, die wiederum Vorläuferzellen der Osteoblasten einschwemmen. Der gehärtete Kallus besteht nun aus Geflechtknochen.

VI) Es folgt die **Phase des Umbaus** (modeling und remodeling), in der der Geflechtknochen durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten in einem langwierigen Prozess in Lamellenknochen umgewandelt wird [Einhorn TA 1998], [Barnes GL et al. 1999].

1.3 Zusammensetzung des Knochens

Knochen bestehen aus Zellen und aus extrazellulärer Matrix. Letztgenannte beinhaltet 35 % organische und 65 % anorganische Substanzen. Der anorganische Teil besteht hauptsächlich aus Kalzium und Phosphaten in Form des schwerlöslichen Salzes Hydroxyapatit. Der organische Teil der Knochenmatrix wird in Kollagen und Nicht-Kollagen-Proteine aufgeteilt. Kollagen I macht mehr als 90 % der organischen Masse der Knochenmatrix aus und ist das Hauptstrukturprotein des Knochens. Die übrigen knapp 10 % der Nicht-Kollagen-Proteine haben verschiedene Funktionen in der Regulation der Mineralisation, der Vermittlung von Verbindungen zwischen Zelle und Matrix und der Steuerung verschiedener Interaktionen mit Strukturproteinen. In dieser Fraktion haben Osteocalcin und Osteonectin den größten Anteil. Sie haben spezifische Kalzium-bindende Eigenschaften. Weitere Nicht-Kollagen-Proteine sind Osteopontin, Bone sialoprotein, Trombospondin und Wachstumsfaktoren. Der Anteil der Wachstumsfaktoren an der Gesamtheit der organischen Substanzen liegt bei unter 0,1 %. [Lind M 1998]

1.4 Wachstumsfaktoren

Im Jahre 1965 veröffentlichte Marshall R. Urist einen Artikel über die ektope Neubildung von Knochen in implantierter demineralisierter Knochenmatrix. Für die Versuche wurden lange Knochen aus Kaninchen in 1 bis 2 cm lange Stücke geschnitten und in Salzsäurelösung dekalzifiziert. Die Proben der entkalkten diaphysären Knochen wurden, nachdem die Säure ausgewaschen wurde, u.a. in verschiedene Muskeln von Kaninchen, Ratten, Mäusen und Meerschweinchen implantiert. Nach frühestens 4 bis 6 Wochen erschienen die ersten Ablagerungen von neuem Knochen. Nach 8 bis 16 Wochen wurden Knorpelnester durch Knochen über den charakteristischen Weg der enchondralen Ossifikation ersetzt. Urist beobachtete, dass sich die Knochenneubildung nur dort ereignete, wo Stammzellen, Vorläuferzellen von Osteoblasten und kleine von Osteoblasten umsäumte Kapillaren waren. Außerhalb der Implantate gab es keine Knochenneubildungen. Diese rein morphologischen Ergebnisse warfen die Frage auf, ob sich in der Knochenmatrix Substanzen befinden, die die Knochenneubildung induzieren [Urist MR 1965].

Einige Jahre später extrahierten Marshall R. Urist und seine Kollegen schließlich ein osteoinduktiv und chondroinduktiv wirkendes Molekül, welchem sie den Namen *Bone morphogenetic protein* gaben, einem Wachstumsfaktor aus der Transforming growth factor beta-Superfamilie [Urist MR et al. 1979].

1.4.1 Transforming growth factor beta

Die Wachstumsfaktoren der Transforming growth factor beta-Superfamilie sind bedeutende Regulatoren vieler zellulärer Prozesse. Diese Moleküle sind ubiquitär vorhanden und beinhalten in der Familie Mitglieder wie Bone morphogenetic proteins (BMP), Aktivine, Inhibine, Growth and differentiation factors und die fünf identifizierten Isoformen von Transforming growth factor beta (TGF- β), von denen bekannt ist, dass TGF- β 1 (u.a.) wichtig für die Regulation verschiedener Zellarten von Säugetieren ist [Ai-Aql ZS et al. 2008], [Rosier RN et al. 1998].

Das Peptid TGF- β 1 hat eine Molmasse von ca. 25 kd und ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer von zwei Polypeptiden mit jeweils 112 Aminosäuren. Es lässt sich in höchster Konzentration im Knochen und in den Thrombozyten nachweisen [van den Eijnden-van Raaij AJ et al. 1988]. TGF- β 1 wird als Vorläufer mit großen Prosegmenten synthetisiert, welche vom C-terminalen reifen Monomer abgespalten werden. Zwei Moleküle des Prosegments binden nicht kovalent an das reife TGF- β 1-Dimer und halten es so in einer biologisch inaktiven Form,

welche nicht fähig ist, an Rezeptoren zu binden. Eine Aktivierung ist somit notwendig, damit TGF- β 1 an den Rezeptor binden kann [Derynck R et al. 1997].

Dieses multifunktionale Peptid hat eine große Bandbreite an zellulären Aktivitäten. Es kontrolliert unter anderem die Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Im hohen Maße kann TGF- β 1 in reifen Osteoblasten, die dieses Peptid selber produzieren, in der Knochenmatrix, auf Knochenoberflächen während der Knochenentwicklung, während des Knochenwachstums und im Kallus heilender Frakturen nachgewiesen werden [Linkhart TA et al. 1996]. TGF- β 1 spielt somit eine zentrale Rolle bei der Chondrogenese und Osteogenese, indem es die Replikation, die Genexpression und die Proteinsynthese in beinahe allen Zelltypen beeinflusst, die bei der Knochenbildung involviert sind. Auch bei der Heilung von Weichteilgewebe reguliert TGF- β 1 die komplexen Kaskaden von Zellaktionen. Dieser Prozess wird bei der Freisetzung von TGF- β 1 durch degranulierende Thrombozyten initiiert, wie es zum Beispiel bei einer Blutung nach einem Knochenbruch geschieht. Die Expression von TGF- β 1 im Periost steigt bei mechanischer Belastung stark an ähnlich wie bei IGF-I. [Linkhart TA et al. 1996][Joyce M et al. 1990]

1.4.2 Insulin-like growth factor

Das Wachstumshormon Growth hormone (GH) wird durch die Hypophyse sezerniert und hat wachstumsfördernde und metabolische Effekte auf verschiedene Gewebe im Körper. GH gelangt über die Blutzirkulation an sein Zielgewebe wie die Leber und die Wachstumsfuge. Wenn GH an spezifische Zelloberflächenrezeptoren bindet, stimuliert es diese Zellen zur Produktion von Insulin-like growth factor (IGF). IGF kann dann in die Blutbahn gelangen, wo es über die Zirkulation an seine Zielzellen gelangt (endokrine Wirkung), es kann lokal an Zelloberflächenrezeptoren von benachbarten Zellen binden (parakrine Wirkung) und kann an Zelloberflächenrezeptoren der selben Zelle binden, die IGF produziert hat (autokrine Wirkung). Obwohl IGF-II quantitativ der häufigste vorhandene Wachstumsfaktor im Knochen ist, weiß man, dass IGF-I potenter ist und in heilenden Frakturen beim Menschen und bei der Ratte nachgewiesen worden ist. Außerdem ist die biologische Wirkung von IGF-II ähnlich oder identisch der von IGF-I. Deshalb haben sich Studien bei der Bewertung der Rolle von IGF bei der Frakturheilung auf IGF-I konzentriert [Trippel S et al. 1996].

Das Peptid IGF-I hat eine Molmasse von ca. 7,6 kD und besteht aus 70 Aminosäuren mit drei intramolekularen Disulfidbrücken. Außer in der Leber konnte es in Osteoblasten und in vielen

anderen extrahepatischen Zellarten nachgewiesen werden. IGF-I bindet mit höchster Affinität an den IGF-Rezeptor Typ 1, der eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Insulin-Rezeptor hat. Mit geringerer Affinität bindet auch IGF-II an den IGF-Rezeptor Typ 1 und noch geringer auch Insulin [Eriksen E et al. 1996].

Die Halbwertszeit von freiem IGF bei systemischer Sekretion ist kurz. Das meiste IGF-I ist bei der Zirkulation und in Gewebeflüssigkeit an Transportproteine gebunden, den so genannten IGF-binding proteins (IGFBP), von denen bisher 6 bekannt sind (IGFBP-1 bis 6). Diese transportieren IGF-I, erhöhen die Halbwertszeit und regulieren seine Wirkung auf Zielzellen. Die meisten IGFBP hindern die Bindung von IGF mit seinem Rezeptor und verhindern somit die IGF-Wirkung. IGFBP-5 hingegen kann die Wirkung von IGF verstärken. Insbesondere bindet es sehr stark an Hydroxyapatit [Eriksen E et al. 1996]. IGF, welches von Osteoblasten produziert worden ist und an IGFBP-5 gebunden ist, wird in die Knochenmatrix eingearbeitet. IGF-I und II sind die am reichlichsten vorhandenen Wachstumsfaktoren im Knochen. [Eriksen E et al. 1996][Linkhart TA et al. 1996]

IGF-I hat viele verschiedene Wirkungen auf Zellen des skeletalen Systems. Die Expression von IGF-I ist besonders hoch in der Wachstumsfuge, im Kallusgewebe heilender Frakturen und im sich bildenden Periost. IGF-I stimuliert die Proliferation von Osteoprogenitorzellen, verstärkt die Kollagensynthese und vermindert den Kollagenabbau, erhöht die Expression von Proteinen wie alkalische Phosphatase und Osteocalcin und stimuliert die Bildung von Knochen. Bei mechanischer Belastung steigt die Menge von IGF-I im Periost an gefolgt von einer späteren Zunahme der Zellproliferation im Periost. [Linkhart TA et al. 1996], [McCarthy T et al. 1989], [Pfeilschifter J et al. 1990]

1.4.3 Weitere Wachstumsfaktoren

Platelet derived growth factor (PDGF) wird in Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert und beeinflusst die meisten mesenchymalen Zellen. Dieser Wachstumsfaktor erhöht die Zellreplikation und die Proteinsynthese unter anderem im skeletalen System. Er stimuliert neben Zellen aus der Osteoblasten-Linie auch nicht skeletale Fibroblasten. PDGF wird wahrscheinlich bei der Thrombozytenaggregation freigesetzt und ist wichtig für die Heilung von Wunden und Frakturen. [Solheim E 1998]

Fibroblast growth factors (FGF) werden von verschiedenen Zellen produziert wie Monozyten, Makrophagen, Myozyten, Osteoblasten und Chondrozyten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei

der Angiogenese und haben einen mitogenen Effekt auf Chondrozyten, Osteoblasten und auf viele verschiedene mesenchymale Zellen. Mutationen im FGF-Rezeptor können zu schweren Fehlbildungen im Skelett führen. Außerdem konnten in der frühen Phase der Frakturheilung FGF identifiziert werden. [Lieberman JR et al. 2002]

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein Glycoprotein, welches in Form eines Dimers aufgebaut ist ein zellspezifisches Mitogen für das Endothel darstellt. Es spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Modulation der Angiogenese, der Bildung von neuen Blutgefäßen, und hat damit eine wichtige Funktion bei der Frakturheilung. Osteoblasten zeigen eine erhöhte Synthese von VEGF in hypoxischer Umgebung, wie sie im Frakturbereich vorkommt. Zusätzlich induziert TGF- β 1 die Expression von VEGF in Osteoblasten. [Saadeh PB et al. 1999], [Spector JA et al. 2001]

1.5 Wachstumsfaktoren und Knochenheilung

Bei der Versorgung von Frakturen sind die Osteosynthesematerialien und die Operationstechniken mittlerweile sehr weit entwickelt. Große Verbesserungen sind in diesen Bereichen für die Knochenheilung nicht zu erwarten. Mit Wachstumsfaktoren eröffnet sich ein neues Feld an Möglichkeiten, die Frakturheilung positiv zu beeinflussen und damit die Komplikationsrate weiter zu reduzieren.

Noch 1993 hielt Mundy Wachstumsfaktoren als therapeutische Möglichkeit für nicht überzeugend. Es sind Peptide mit einer kurzen Halbwertszeit bei systemischer Verabreichung, und sie beeinflussen viele verschiedene Zellarten mit möglicherweise toxischen Effekten [Mundy GR et al. 1993]. Heutzutage ist das Interesse an der Entwicklung von klinischen Anwendungen mit Wachstumsfaktoren sehr groß. Ziel ist es, die Knochenheilung zu verstärken wie z.B. die Beschleunigung der Frakturheilung, die erfolgreiche Behandlung von knöchernen Defekten, von Pseudarthrosen und die Verstärkung von spinalen Fusionen.

In zahlreichen experimentellen Studien konnte ein positiver Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung gezeigt werden.

So führte bei Toriumi et al. die lokale Applikation von BMP-2 zu einer schnelleren Regeneration und Belastbarkeit von Defekten im Unterkiefer von Hunden. Die stabilisierenden Platten am Unterkiefer konnten nach 10 Wochen entfernt werden, da der Defekt mit neu gebildetem und mineralisiertem Knochen überbrückt wurde. In der Kontrollgruppe zeigte sich nur eine minimale Knochenbildung, die eine Entnahme der Platte wegen Instabilität verhinderte. Histomorphometrische und biomechanische Untersuchungen zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede. [Toriumi DM et al. 1991]

Nakamura et al. zeigte eine beschleunigte Heilung von Tibiafrakturen im Hundemodell durch die lokale Applikation von basischem Fibroblast Growth factor (bFGF). Sie beobachteten eine Verstärkung des Kallusremodelings. [Nakamura T et al. 1998]

Kandziora et al. untersuchte im Schafsmodell die Fusion zervikaler Wirbelkörper mit Hilfe von IGF-I und TGF- β 1. Dosisabhängig zeigten sich bei mittleren und hohen Dosen ein größeres knöchernes Kallusvolumen, eine festere biomechanische Stabilität und eine frühere Knochenmatrixbildung. [Kandziora F et al. 2002]

In den Forschungsarbeiten werden verschiedene Methoden der Applikation von Wachstumsfaktoren angewendet mit unterschiedlichen Vorteilen, Nachteilen und Ergebnissen.

Wachstumsfaktoren werden systemisch über subkutane und intravenöse Injektionen, Katheter und Pumpen verabreicht [Nakamura T et al. 1995], [Nilsson A et al. 1987], [Raschke M et al. 2001], [Thaller SR, Hoyt J et al. 1993].

Lokal werden Wachstumsfaktoren in Form von Injektionen, Kollagengel, Kollagenschwämmen, Minipellets und in Form von beschichteten Implantaten verabreicht [Bax BE et al. 1999], [Inui K et al. 1998], [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001]. Als eine sehr interessante Möglichkeit der Applikation erweisen sich mit Biomaterialien beschichtete Implantate. In diese beschichteten „bioaktiven Implantate“ werden Wachstumsfaktoren eingearbeitet, so dass das Osteosynthesematerial nicht nur der Stabilisierung der Fraktur dient, sondern auch als Träger von Wachstumsfaktoren, die die Frakturheilung beschleunigen sollen [Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A et al. 2001].

Ein Drug Delivery System sollte mehrere Anforderungen erfüllen. Zum einen sollten die Implantate mit dem Trägermaterial einfach zu beschichten sein. Eine gute Haftung am Implantat mit hoher Abriebfestigkeit ist notwendig, da es während der operativen Implantation von Osteosynthesematerial unvermeidlich zu Reibungen kommt. Zusätzlich sollte das Trägermaterial gut verträglich sein, sollte vom Organismus vollständig metabolisiert werden können und keine allergischen, toxischen und andere unerwünschten Wirkungen auslösen. Die Wachstumsfaktoren sollten möglichst kontrolliert über einen längeren Zeitraum abgegeben werden, so dass sie auch einen längerfristigen Effekt haben. Schlussendlich wäre eine wirtschaftliche und unkomplizierte Produktion wünschenswert. [Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A et al. 2001].

Eine Beschichtung mit Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) erfüllt diese Anforderungen. Das PDLLA ist ein degradierbares Polymer der Milchsäure. Das Milchsäuremolekül hat ein Chiralitätszentrum, so dass es zwei Enantiomere dieses Moleküls gibt. Die D-Form und die L-Form (Siehe Abbildung 2).

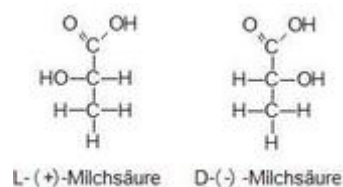


Abbildung 2: Links die L- und rechts die D-Form des Milchsäuremoleküls

Bei der Polymerisation des Racemats der Milchsäure, eines Gemisches der D- und L-Form, entsteht das Polylaktid PDLLA (Siehe Abbildung 3).

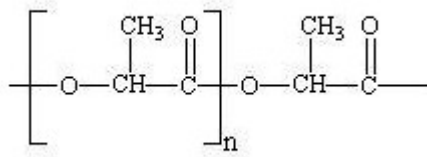


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Poly(D,L-Laktid) (PDLLA)

Die Degradation von Polymeren erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Im Organismus wird PDLLA hauptsächlich durch hydrolytische Spaltung zu Laktat abgebaut. Laktat wird weiter zu Pyruvat dehydriert und dann zu Acetyl-Coenzym A (CoA), um dann in den Citratzyklus einzutreten. [Laurencin C et al. 1994], [Peltoniemi HH et al. 1999]

Untersuchungen haben gezeigt, dass Polylaktide eine gute Biokompatibilität aufweisen [Hutmacher D et al. 1996]. Es wurden lediglich Entzündungsreaktionen gesehen, die von der Rate der Degradation und von der Art des umgebenden Gewebes abhingen. Mandibulafrakturen an Hunden, die mit PDLLA-Pins versorgt wurden, zeigten im Vergleich zur Versorgung mit Stahl-Pins keine Unterschiede in der Heilungsrate [Kulkarni RK et al. 1971]. Buchholz et al. versorgte am Menschen medial dislozierte Sprunggelenksfrakturen mit Polylaktid-Schrauben. Die Ergebnisse nach einem durchschnittlichen Follow up von 37 Monaten waren äquivalent zur mit Stahlschrauben versorgten Kontrollgruppe [Buchholz RW et al. 1994].

Die Verwendung von PDLLA zur Beschichtung von Osteosynthesematerial hat gezeigt, dass die Frakturheilung im Rattenmodell positiv beeinflusst werden konnte. Diese Beschichtung wurde entweder mit eingearbeiteten Wachstumsfaktoren untersucht oder ohne. Dabei zeigte sich der Heilungsverlauf mit Wachstumsfaktoren und PDLLA-Beschichtung als auch im geringeren Maße nur mit der PDLLA-Beschichtung fortgeschritten im Vergleich zur Kontrollgruppe [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001]. Zu den unterschiedlichen kurz- und mittelfristigen Untersuchungszeitpunkten wurden keine veränderten Fremdkörperreaktionen im Vergleich zu unbeschichtetem Osteosynthesematerial gefunden [Wildemann B, Sander A et al. 2005]. Die Applikation von Wirksubstanzen über eine PDLLA-Beschichtung scheint somit eine interessante und praktikable Möglichkeit zu sein, kurzlebige Wachstumsfaktoren über einen längeren Zeitraum abgeben zu können. [Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F et al. 2002]

1.6 Ziele dieser Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit werden zwei Ziele verfolgt:

1. Es soll die physiologische Heilung der Tibiafraktur am Rattenmodell untersucht werden. Ein spezielles Augenmerk liegt dabei auf der Phase des Remodelings (12 Wochen postoperativ).
2. Die Langzeitwirkung von lokal applizierten Wachstumsfaktoren soll untersucht werden. Dabei wird ein spezielles Drug Delivery System in Form von beschichteten Implantaten mit eingearbeiteten Wachstumsfaktoren verwendet.

Zur Anwendung kommen radiologische Verlaufsuntersuchungen, biomechanische Tests zur Prüfung der Knochenstabilität und die histomorphologische und histomorphometrische Beurteilung des Kallusgewebes. Bisher gibt es in der Literatur für den Zeitraum von 12 Wochen am Rattenmodell keine Angaben, so dass mit dieser Studie Erkenntnisse zur Frakturheilung und zum Remodeling gewonnen werden sollen. Die Untersuchungen des lokal über die PDLLA-Beschichtung applizierten IGF-I und TGF- β 1 sollen zeigen, welche Effekte sowohl die Wachstumsfaktoren als auch die PDLLA-Beschichtung ohne Wachstumsfaktoren nach 12 Wochen haben. Über den Vergleich der physiologischen Frakturheilung mit der beeinflussten Frakturheilung soll diese Arbeit Rückschlüsse auf die Sicherheit dieser Applikationsmethode ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden den Ergebnissen früherer Arbeiten mit kürzeren Laufzeiten gegenübergestellt, bei denen die selbe Applikationsmethode und die gleichen Wachstumsfaktoren verwendet wurden, um eine gute Aussagekraft über den langfristigen Verlauf ermöglichen zu können.

1.6.1 Hypothese dieser Arbeit

Die kombinierte Applikation von IGF-I und TGF- β 1 über die biodegradierbare PDLLA-Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung, ohne die physiologische Frakturheilung im langfristigen Verlauf zu verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Implantate und Beschichtung

2.1.1 Implantate

Sterile 15 cm lange Titan Kirschner-Drähte mit 1 mm Durchmesser (Synthes, Medizinaltechnik GmbH, Bochum, Deutschland)

2.1.2 Wachstumsfaktoren

Rekombinanter humaner Transforming growth factor beta 1 (rh-TGF- β 1) in 1 % der Gesamtbeschichtungsmasse (w/w) entspricht 10 μ g, (R&D Systems®, Wiesbaden, Deutschland).

Rekombinanter humaner Insulin-like growth factor I (rh-IGF-I) in 5 % der Gesamtbeschichtungsmasse (w/w) entspricht 50 μ g, (R&D Systems®, Wiesbaden, Deutschland).

2.1.3 Trägermaterial

- Poly(D,L-Laktid): Molekulargewicht 30 kD (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

2.1.4 Beschichtungsverfahren

- Trägermaterial Poly(D,L-Laktid) (Siehe 2.1.3)
- Chloroform (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Sterilfilter (Minisart, 0,2 μ m, Sartorius®, Deutschland)
- rh-TGF- β 1 und rh-IGF-I (Siehe 2.1.2)

100 mg Trägermaterial Poly(D,L-Laktid) wird in 1,5 ml Chloroform bei Zimmertemperatur gelöst und steril filtriert. Anschließend werden die sterilen Wachstumsfaktoren rh-TGF- β 1 und rh-IGF-I hinzugefügt. Die sterilen Kirschner-Drähte werden zweimal in die vorbereitete Lösung eingetaucht und luftgetrocknet.

Da dieses Verfahren bei Raumtemperatur geschieht, wird es „kaltes Beschichtungsverfahren“ genannt. Die Eigenschaften dieser bioaktiven Beschichtung wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht. Intramedulläre Implantations- und Extraktionsexperimente zeigten einen Verlust der PDLA-Beschichtung von weniger als 5 % [Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A et al. 2001].

2.2 Versuchstiere

- Sprague Dawley Ratten (Haarlarn-Winkelmann, Borcheln, Deutschland)

Es werden weibliche, fünf Monate alte Sprague Dawley Ratten (n=60) verwendet, die zu Beginn zwischen 243 und 297 g wiegen. Eine einwöchige Phase erlaubt den Tieren eine Gewöhnung an die neue Umgebung. Sie werden zu fünf in Typ 3 – Käfigen bei 22°C gehalten. Wasser und Nahrung stehen ihnen jederzeit zur Verfügung. Die Versuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Aktenzeichen G 0148/99, genehmigt am 06.10.1999).

Es gibt viele Untersuchungen der beeinflussten und unbeeinflussten Frakturheilung am Rattenmodell. In vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde die Ratte als Versuchstier zur Untersuchung der Frakturheilung schon verwendet. Dabei wurden dieselben Methoden und Untersuchungstechniken angewendet und die äußeren Bedingungen möglichst gleich gelassen, um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen den verschiedenen Studien zu erreichen. [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2000], [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001], [Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F et al. 2002]

2.3 Gruppeneinteilung

In dem Versuch werden drei Gruppen untersucht: Die Kontrollgruppe mit unbeschichteten Implantaten, eine Gruppe mit PDLLA-beschichteten Implantaten und eine Gruppe mit PDLLA-beschichteten Implantaten mit den Wachstumsfaktoren IGF-I (5 % w/w) und TGF-β1 (1 % w/w). In jeder der drei Gruppen werden 20 Tiere operiert, von denen jeweils die Hälfte für die biomechanische Testung und für die Histologie eingeteilt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Gruppen

Gruppen	Biomechanik	Histologie
Unbeschichtete Implantate (Kontrollgruppe)	n=10	n=10
PDLLA-beschichtete Implantate	n=10	n=10
PDLLA und IGF-I und TGF-β1 (WF-Gruppe)	n=10	n=10

2.4 Operatives Vorgehen

2.4.1 Narkose und Vorbehandlung

- Narkosegerät mit Schlauchsystem, Inhalationsmaske und Kunststoffbox (Anaesthesie-GME 4, Typ Vet, ARTEC Stephan, 56412 Gackebach, Deutschland)
- Isofluran 3-5 % (Forene® Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland; Lachgas 2 l / min, Sauerstoff 1,2 l / min)
- Waage (Kilomatpräzisionswaage, Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Digitales Thermometer (Paul Hartmann AG, Steinheim, Deutschland)
- Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100 mg / ml, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Xylazin® 2 % (Xylazinhydrochlorid, Sanofi Ceva GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Rasierapparat (Aesculap Favorita II GT 104, Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland)
- Pilca® Enthaarungscreme (Schwarzkopf & Henkel Cosmetics, Düsseldorf, Deutschland)
- Augensalbe Panthenol (Jenapharm, Vertrieb Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Sterilium® (Softaderm, B / BRAUN Melsungen AG, 34209 Melsungen, Deutschland)
- Einmal-Skalpell No.15 (Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division, USA)
- Kirschnerdraht aus Stahl, 1 mm und 0,8 mm Durchmesser

Die Ratte wird in eine speziell angefertigte Inhalationsbox gesetzt, die mit einem Deckel luftdicht verschlossen wird. Diese Box enthält ein Zuflußsystem für das Isofluran-Sauerstoff-Lachgas-Gemisch sowie ein Abflußsystem für die überschüssigen und verbrauchten Gase. Sobald die Ratte narkotisiert ist, wird sie aus der Box genommen. Zur Fortsetzung der Inhalationsnarkose außerhalb der Box wird eine speziell für die Schnauze angepasste Inhalationsmaske verwendet, aus der dieselbe Gasmischung herausströmt.

Unter Narkose wird das Tier gewogen, und die Temperatur wird rektal gemessen.

Nach der Untersuchung wird die Narkose mit einem intraperitonealem Injektionsgemisch fortgeführt. Die Mischung von Ketavet (80 mg / kg Körpergewicht) und Xylazin (12 mg / kg Körpergewicht) wird transabdominal appliziert.

Die Ratte wird am rechten Hinterlauf elektrisch rasiert und mit Pilca-Creme enthaart. Zusätzlich wird Augensalbe aufgetragen und der Schwanz mit wasserfesten Stiften markiert. Nach

Desinfektion und steriler Abdeckung des Hinterlaufs erfolgt am ventralen Unterschenkel mit dem Skalpell eine 1 cm große Hautinzision. Mit einem 1,0 mm Kirschner-Draht wird der Markkanal durch eine bohrende Bewegung von medio-anterior eröffnet. Dann wird der Markkanal mit dem Vorschieben eines 0,8 mm Kirschnerdrahts nach distal hin vorbereitet. Dies ermöglicht eine stabile Reposition.

2.4.2 Fraktur

Um eine standardisierte, geschlossene Fraktur der Tibia und Fibula mit definiertem Weichteilschaden an Ratten zu erzeugen, wurde die Frakturmaschine entwickelt (Siehe Abbildung 4).

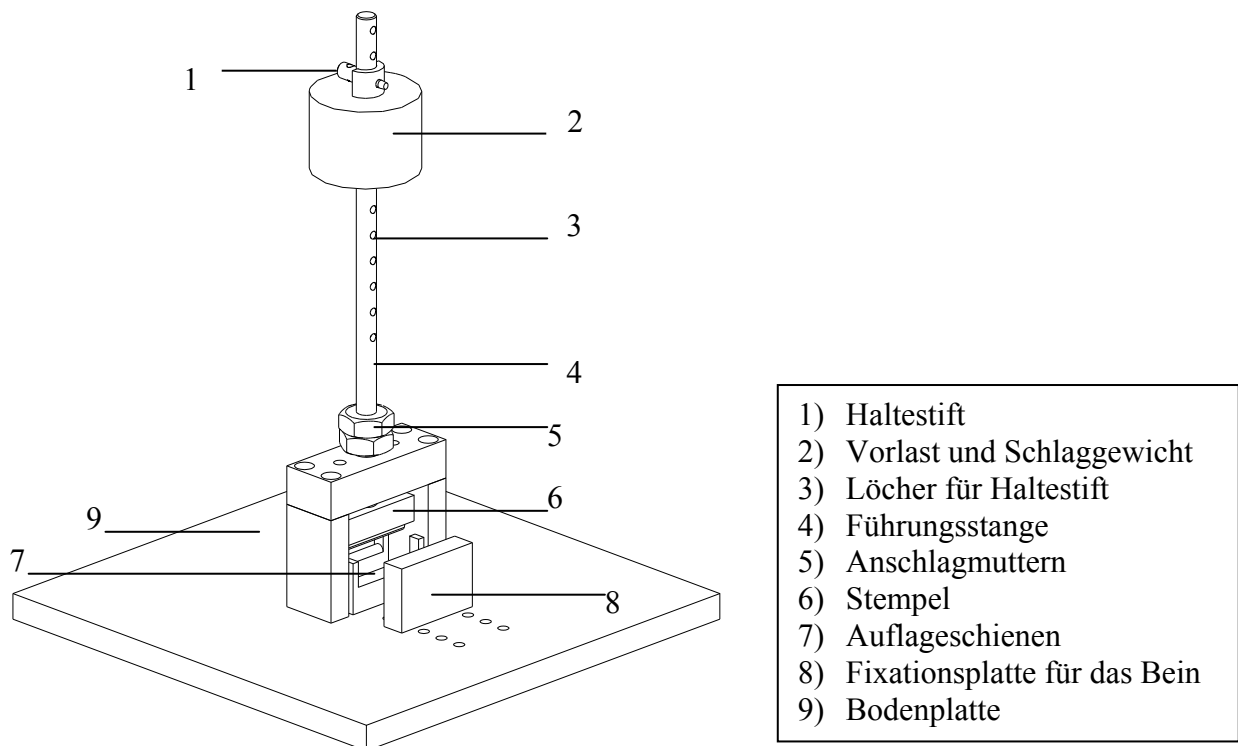


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Frakturmaschine

Diese Maschine funktioniert nach dem Prinzip der Dreipunktbiegung. Der nach außen rotierte rechte Hinterlauf wird auf zwei Schienen mit 20 mm Abstand gelagert und mit einer variabel verstellbaren Stopplatte fixiert. Ein durch drei Stifte geführter Stempel wird auf der Margo anterior, die nicht von Weichteilen bedeckt wird, 2-4 mm proximal des tibiofibularen Winkels platziert. Die Tibia wird durch den Stempel mit einer Masse von 650 g belastet, wovon 600 g in Form eines Gewichts in einer Höhe von 15 cm gehalten werden. Durch die Entfernung des Haltestifts fällt das Gewicht, geführt durch eine Schiene, auf den Stempel. Der hierdurch

entstehende Impuls von $p = 1,12 \text{ Ns}$ verursacht eine geschlossene Fraktur der Tibia und Fibula (Siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Die Ratte ist in die Frakturmaschine gesetzt worden. Der Hinterlauf ist so positioniert, dass die Tibia mittig frakturiert, sobald das Gewicht auf den Unterschenkel fällt.

2.4.3 Stabilisierung

- Kirschnerdraht aus Titan, 1 mm Durchmesser
- Seitenschneider
- Chirurgische Instrumente (Nadelhalter, chirurgische und anatomische Pinzetten, Präparier- und Fadenschere)
- Prolene®, nicht resorbierbarer Hautfaden 4/0 (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland)
- Ankerplast® (Wundschnellverband, Chauvin Ankerpharm GmbH; Rudolstadt, Deutschland)
- Leukoplast® (Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland)

Nun werden die Frakturrenden reponiert und die Tibia mit einem je nach Gruppenzugehörigkeit beschichteten (PDLLA oder PDLLA + Wachstumsfaktoren) oder unbeschichteten (Kontrolle) Titankirschner-Draht intramedullär stabilisiert (Siehe Abbildung 6).

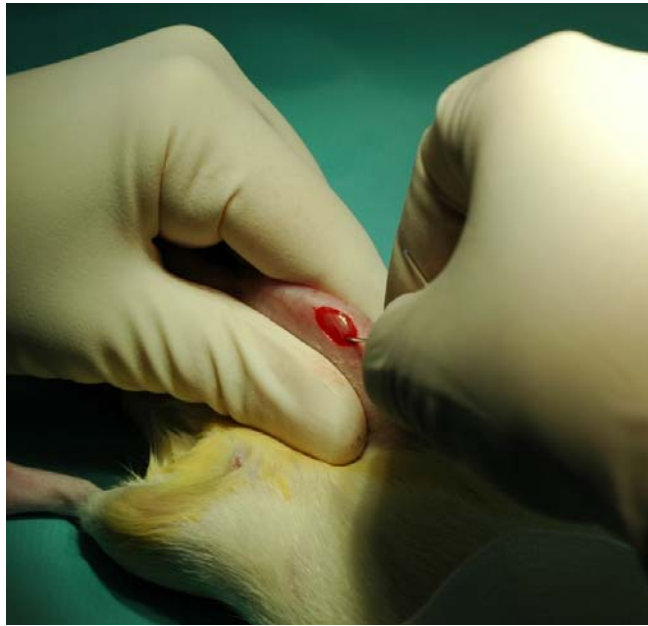


Abbildung 6: Nagelinsertion

Ist der Draht richtig positioniert, wird der aus der Wunde ragende Anteil so knapp wie möglich am Austritt aus dem Knochen mit einem Seitenschneider abgetrennt. Die Wunde wird mit einer Einzelknopfnah, Desinfektion, Sprühpflaster und radiär verlaufendem Leukoplast-Verband versorgt.

2.5 Untersuchungen

Durchführung der Röntgenkontrolle:

- Röntgengerät: Mobilett Plus (Siemens AG, München, Deutschland)
- Fujispeicherfolie für IP Cassette (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan); FUJIFILM IP CASSETTE 3A 24x30 cm (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)
- Entwickler FCR 5000 (Fuji Photo Film Co., LTD. Japan)

Zur Lagekontrolle der reponierten Knochenanteile und des Drahtes wird unmittelbar postoperativ ein Röntgenbild des Hinterlaufs in zwei Ebenen gemacht (Siehe Abbildung 7). Dafür wird die Ratte, die immer noch in Vollnarkose ist, auf die Röntgenplatte gelegt; das Bein wird in einer Styroporscheine und mit Leukoplast kurz so fixiert, dass es zunächst von posterior-anterior und dann von der Seite aufgenommen werden kann.

In gleicher Weise wird bei den späteren Untersuchungen die radiologische Kontrolle durchgeführt. Das Röntgengerät hat bei der Aufnahme einen Abstand von 60 cm von der Platte, die Belichtungszeit beträgt 1,8 mA/s, die Röhrenspannung ist auf 52 kV eingestellt.



Abbildung 7: Postoperative Röntgenkontrolle: Posterior-anteriore (links) und laterale (rechts) Aufnahme

Die Untersuchungen zu den späteren Zeitpunkten erfolgen alle unter Inhalationsnarkose (Siehe 2.4.1). Am 7. postoperativen Tag werden der Verband und die Fäden vorsichtig mit Skalpell, Schere und Pinzette entfernt. Dabei werden gegebenenfalls zu beobachtende Auffälligkeiten notiert. Die Tiere werden dann außerdem 4, 6, 8 und 12 Wochen nach der OP untersucht. Nach Inspektion des Tieres erfolgen die Gewichtsmessung und die rektale Temperaturmessung. In Maskennarkose werden weiterhin von der Tibia Röntgenbilder in zwei Ebenen angefertigt. Danach wird das jeweilige Tier wieder in den Käfig gelegt, wo es kurze Zeit später wieder aufwacht.

2.6 Tötung und Präparation

2.6.1 Tötung

- Kaliumchloridlösung 7,45 %, 20ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Zwölf Wochen postoperativ erfolgt die Tötung direkt nach den Untersuchungen. Während der Inhalationsnarkose wird der Ratte intrakardial 7,45 % Kaliumchloridlösung gespritzt. Der klinische Tod erfolgt in wenigen Sekunden.

2.6.2 Präparation

- Chirurgische Instrumente (Einmal-Skalpelle, Nadelhalter, chirurgische und anatomische Pinzetten, Präparierschere, Faszange)
- Natriumchloridlösung 0,9 %, 50 ml (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland)

Nach der Tötung wird das Knie der Ratte freipräpariert. Das Ligamentum patellae, die Kollateralbänder und die Kreuzbänder werden durchtrennt; das Kniegelenk wird exartikuliert. Daraufhin wird die Tibia von allen Muskeln, Sehnen, Bändern und der Fibula freipräpariert ohne Verletzung des Periosts.

Zur Entfernung des Kirschner-Drahtes werden mit dem Skalpell Verwachsungen im Bereich des überstehenden Drahtes abpräpariert, so dass mit der Faszange zugegriffen werden kann. Unter langsamen axialen Drehbewegungen kann der Kirschnerdraht herausgezogen werden. Dabei wird darauf geachtet, dass der Kallus gut fixiert wird, damit er möglichst keine Scherkräfte erfährt.

Für die biomechanische Testung wird zusätzlich die kontralaterale Tibia in gleicher Weise präpariert. Bis zur biomechanischen Untersuchung werden die Knochen in mit 0,9 %iger NaCl-Lösung getränkter Mullbinde feucht gehalten, um das Knochengewebe vor der Austrocknung zu schützen.

2.7 Biomechanische Testung

Für die biomechanische Testung werden 30 Tiere, jeweils zehn aus jeder Gruppe (Kontrollgruppe, PDLLA-beschichtete Gruppe, PDLLA + IGF-I + TGF- β 1), zufällig ausgesucht. Unmittelbar nach der Tötung der Ratten und der Freipräparation der Tibiae werden die Knochen in Formen eingebettet, damit sie biomechanisch untersucht werden können.

2.7.1 Einbettung

- Chirurgische Klemmen und Ständer zum Fixieren
- Kunststoffeinbettformen zu je 3 x 3 x 3 cm
- Technovit-Zement (Technovit® 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)

Die freipräparierten Tibiae werden am proximalen Ende in eine Klemme gespannt und mit Hilfe eines Ständers senkrecht mit dem distalen Ende jeweils in eine Einbettform eingelassen. Der angerührte Technovit-Zement wird in die Einbettformen gefüllt. Nach ca. 8 Minuten ist der Zement ausgehärtet und die Knochen sind fixiert. Man dreht die distal eingebetteten Tibiae um 180°, so dass das proximale Ende senkrecht in jeweils eine weitere leere Einbettform eingelassen wird. Beim Einlassen wird auf horizontale und senkrechte Deckungsgleichheit der Formen geachtet mit einem Abstand von 18 mm zueinander. Dann werden die Formen wieder mit Zement gefüllt. Es liegen nun 18 mm der Diaphyse der beiden Tibiae frei, wohingegen das proximale und das distale Ende über Zement in den Einbettformen fixiert sind (Siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: In Formen zum Einspannen in die Testmaschine eingebettete Tibia.

2.7.2 Messung

- Torsionstestungsapparatur
- Universalprüfmaschine Zwick® (Zwick GmbH & Co, Ulm, Deutschland)
[Parametersatz: Prüfungsgeschwindigkeit: 15 mm/min, Rücklaufgeschwindigkeit: 200 mm/min, Bruchabschaltsschwelle: d_f 8 % F_{max} , obere Kraftgrenze: 40 N, maximale Längenänderung: 38 mm]
- Meßkraftverstärker Typ MGC (Firma: HBM, Darmstadt, Deutschland)
- Software Catman32® (Firma: HBM, Darmstadt, Deutschland)
- Software Excel® (Firma: Microsoft, USA)

Der in die Formen eingebettete Knochen wird so in die Torsionstestungsapparatur montiert, dass die Längsachse der Tibia und die Rotationsachse der Maschine identisch sind. Zusätzlich erfährt der Knochen eine axiale Vorlast von einem Newton (Siehe Abbildung 9).

Die lineare Kraft der Universalprüfmaschine Zwick® wird über den Hebelarm in eine Torsionskraft umgewandelt. Am anderen Ende des Knochens wird über den anderen Hebelarm mittels Dehnungsmeßstreifens die torsionale Kraft, die auf den Knochen wirkt, vom Messkraftverstärker aufgezeichnet.

Die Universalprüfmaschine Zwick® übt bei der Messung eine konstant zunehmende Kraft auf den Hebelarm aus und misst gleichzeitig dessen Widerstand. Sobald die Tibia der torsionalen Kraft nicht mehr standhalten kann, also bei einem Widerstandsverlust von 8 % und mehr, stoppt die Universalprüfmaschine Zwick®. Der an einen Computer angeschlossene Dehnungsmeßstreifen übermittelt die Daten synchron an das Softwareprogramm Catman32®, wo die Masse, Kraft und das Torsionsmoment ermittelt werden können.

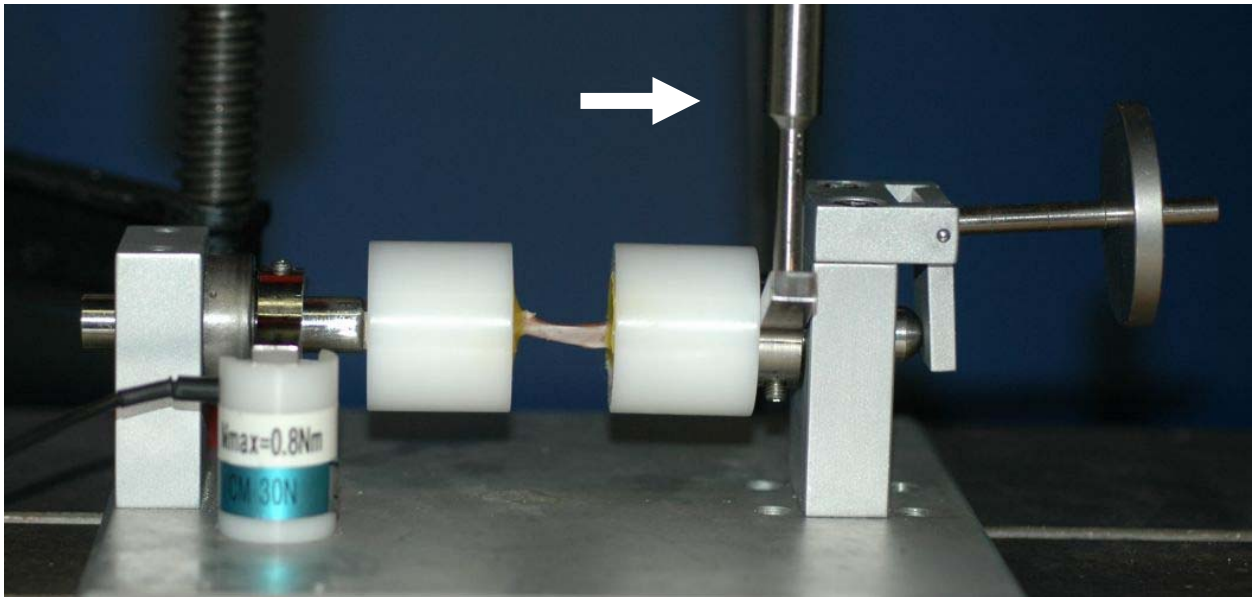


Abbildung 9: Eine Rattentibia ist für die biomechanische Testung in die Torsionstestungsapparatur eingespannt. Die lineare Kraft der Zwick® wird über einen Stiftfortsatz (weißer Pfeil) am Hebelarm in eine Torsionskraft umgewandelt.

2.7.3 Bearbeitung der Daten

Zur Berechnung von Steifigkeit, maximalem Drehmoment und zur grafischen Darstellung werden die Daten in Excel® eingelesen. Die Messdaten werden in einem Schaubild dargestellt, in dem auf der x-Achse die Winkeländerung in [°] und auf der y-Achse das Drehmoment in [Nmm] aufgetragen wird. Das maximale Drehmoment wird aus der Kurve abgelesen bzw. vom Programm angezeigt. In Abbildung 10 beträgt das maximale Drehmoment der frakturierten Tibia (Kontrollgruppe) 240 Nmm. Die Steifigkeit entspricht der Steigung der Kurve, die über die Gleichung ($m = \frac{Y_b - Y_a}{X_b - X_a}$) errechnet wird. Um eine repräsentative Steifigkeit zu erhalten, wird die Steigung aus dem mittleren linearen Bereich angegeben, da die Kurve bei Beginn und beim Maximum nicht zwangsläufig linear verläuft, was man besonders im Anfangsbereich des Beispieldiagramms sieht. Die Steifigkeit wurde mit 31,2 Nmm/° errechnet.

Ratte 754 frakturierte Tibia (Kontrolle)

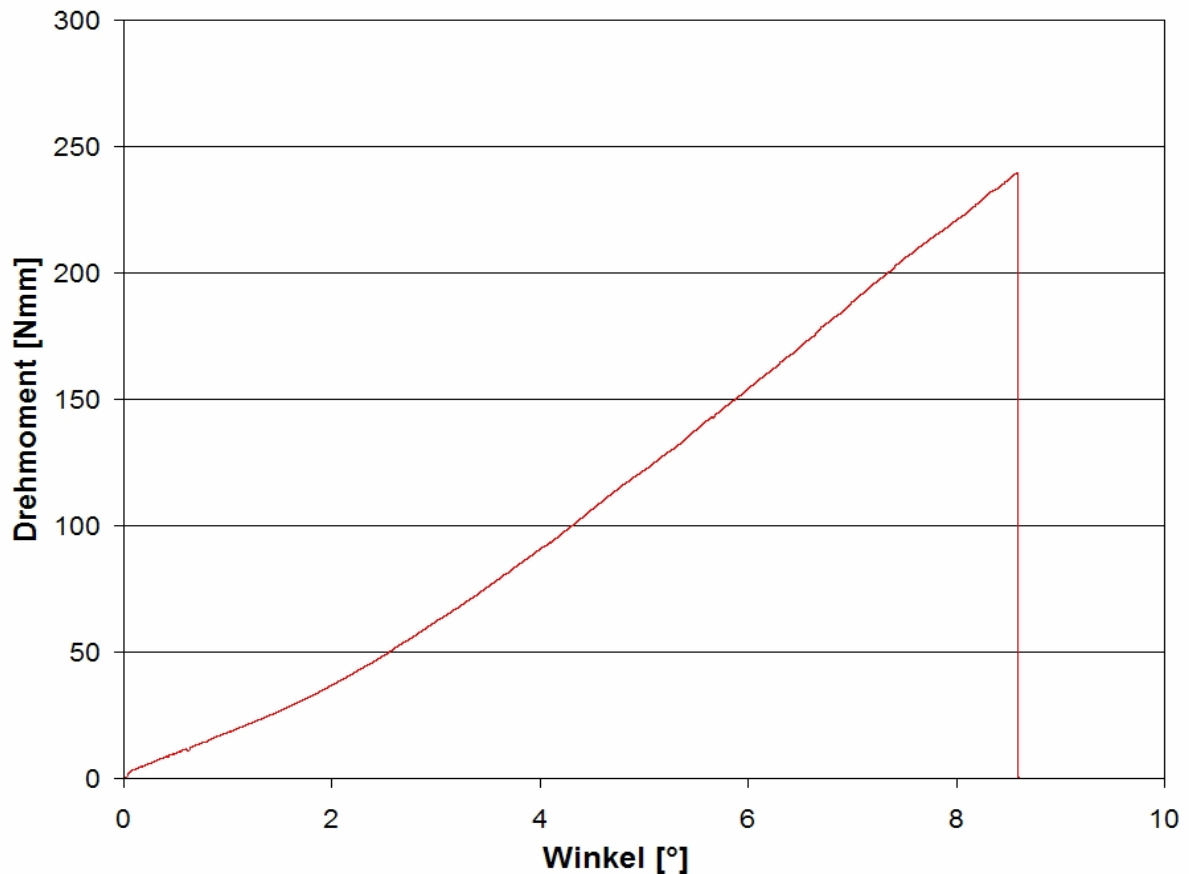


Abbildung 10: Ratte 754 aus der Kontrollgruppe mit unbeschichteten Kirschnerdrähten. Dargestellt sind die Daten der torsionalen Testung einer frakturierten Tibia. Das maximale Drehmoment beträgt 240 Nmm, die Steifigkeit beträgt 31,2 Nmm/°.

Um den individuellen Unterschieden der einzelnen Ratten gerecht zu werden, werden die biomechanischen Ergebnisse der frakturierten Tibia mit der kontralateralen Tibia verglichen. Das Ergebnis der frakturierten Seite wird durch das der gesunden Seite geteilt und mit 100 multipliziert, um ein Prozentergebnis zu erhalten:

$$(\text{Ergebnis frakturierte Tibia} / \text{Ergebnis gesunde Tibia}) * 100 \%$$

Aus den Ergebnissen wird das arithmetische Mittel gebildet $[X_1 + X_2 + \dots + X_{10} / 10]$ und die Standardabweichung berechnet.

2.8 *Knochenaufbereitung für die Histomorphologie/-morphometrie*

2.8.1 Fixation

- Kunststoffkassetten, Tissue Tek, Mega Cassette, Sakura, USA
- Gläser mit Deckel
- Fixierlösung: 324 ml Formaldehydlösung (37 %)
550 ml Ethanol (100 %)
130 ml Barbitol-Na-Puffer (0,1 mol / l, pH 7,3)
6 g Glukose
- Schüttler (HS 501 digital, KIKA Labortechnik, Deutschland)

Nach Tötung der Ratte und zügiger Freipräparierung müssen die Tibiae aufgrund von Zerfallsprozessen möglichst schnell fixiert werden.

Nach Entfernen des intramedullären Kraftträgers werden die Knochen in mit Bleistift beschriftete Kunststoffkassetten gesetzt, die mit gegittertem Boden und Deckel versehen sind. Diese Kassetten werden in verschraubte Gläser mit Fixierlösung gelegt. Die Fixierlösung wird hergestellt aus Formaldehydlösung, Ethanol, Barbitol-Na-Puffer und Glukose. Die Präparate verbleiben in der Fixierlösung für 3 bis 4 Tage auf einem Schüttler.

2.8.2 Dehydration und Entfettung

- Ethanol (70 %, 80 %, 96 %, 100 %)
- Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Nach der Fixation werden die Präparate für 10 min unter laufendem Wasser gespült. Danach entwässert man die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 2).

Tabelle 2: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung

Alkoholreihe (Ethanol)	70 %	80 %	96 %	96 %	100 %	100 %	100 %
Dauer	3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage	7 Tage

Die aufsteigende Alkoholreihe bewirkt eine langsame Entwässerung des Gewebes und reduziert das Auftreten von Rissen und Schrumpfungen des Gewebes.

Schließlich werden die Präparate nach der Entwässerung des Gewebes zur Entfettung für einen Tag in Xylol gelegt.

2.8.3 Einbettung

- Technovit® 9100 New (Heraus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
Präinfiltrationslösung, Infiltrationslösung und Polymerisationsgemisch
- Becherförmige Glasgefäße mit Deckel
- Eis
- Styroporkiste
- Technovit® 3040 (Heraus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Graviergerät GG 12 (PROXXON, Deutschland)

Das Gewebe wird in Technovit® 9100 auf der Basis von Methylmethacrylat eingebettet. Zunächst werden die Präparate in Präinfiltrationslösung für einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgt eine Inkubation mit Infiltrationslösung für 6 Tage bei 4° C wobei nach 3 Tagen die Lösung durch frische ersetzt wird. Dieses Verfahren der Präinfiltration und der Infiltration verspricht ein gutes Durchdringen des Gewebes mit Technovit 9100, welches für eine gute Polymerisation notwendig ist.

Zur Polymerisation werden die Knochen in Gläser hineingelegt und mit frisch zubereitetem Polymerisationsgemisch aufgefüllt, so dass die Tibiae 2 – 3 cm davon bedeckt sind. Zur Markierung wird noch ein kleines Papierstück mit der Rattennummer in das Glas gelassen. Daraufhin verschließt man die Gläser luftdicht mit Deckeln und legt sie für circa 24 h bei 0° C auf reichlich Eis in eine verschließbare Styroporkiste.

Um die auspolymerisierten Blöcke auf eine handliche Größe zu bringen, werden sie aufgeblockt, indem Technovit® 3040 hinzugegossen wird. Nach dem Aushärten werden die Blöcke aus dem Glas genommen. Zum Schluss wird die Rattennummer in jeden Block eingraviert.

2.9 Herstellen der histologischen Schnitte

2.9.1 Schleifen

- Handschleifgerät (Phoenix 3000, Jean Wirtz, Bestellung über Metec, Laborgeräte Vertriebs GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

Mit einem Handschleifgerät werden die zylinderförmigen Technovit-Blöcke für das Einspannen in das Mikrotom in eine rechteckige Form geschliffen.

2.9.2 Objektträgerbeschichtung

- Destilliertes Wasser
- Gelatine für die Mikrobiologie (Merck 4070, E. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 0,5 %iges Chromalaun (Kaliumchrom III – Sulfat, Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland)
- Küvetten
- Objektträger (Superfrost Objektträger, 76 x 26 mm, ISO-Norm 8037, Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)
- Ethanol 100 %

In einem Liter destilliertem Wasser werden 5 g Gelatine und 0,5 g Chromalaun gelöst und bis knapp unter 60° C erhitzt. Diese Gelatinelösung wird in drei Küvetten verteilt. Die Objektträger werden zunächst in destilliertem Wasser, dann in 100-prozentigem Ethylalkohol und zuletzt in den drei Küvetten mit der Gelatinelösung gebadet. Die Objektträger werden über Nacht getrocknet und sind dann einsatzbereit.

2.9.3 Schneiden

- Schlittenmikrotom (SM 2500S, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Schneidmesser (Hartmetall, Schliff 16 cm, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Schneideflüssigkeit (Firma WIV; Schwetzingen, Deutschland)
- Feine Pinzette und Pinsel

- Streckflüssigkeit (30 ml Butoxyethyl-Acetat und 70 ml Ethanol 70 %ig)
- Objektträger (Siehe Kapitel 2.9.2)
- Kisolfolie (farblos, Medim, Histotechnologie GmbH, Gießen, Deutschland)
- Filterpapier
- Wärmeschrank (Function line, Heraeus Instruments, Typ: B12, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland)

Zum Schneiden wird ein Schlittenmikrotom mit einer unteren und einer oberen Schlittenbahn verwendet. Die untere, schräge Schlittenbahn verläuft ansteigend. In ihr wird der Block mit der Tibia fest eingespannt. Die obere Schlittenbahn verläuft horizontal. In ihr wird das Schneidmesser in einem Anstellwinkel von 5-6° eingespannt. Zum Schneiden werden das Messer und der Block auf einer horizontalen Schnittebene gegeneinander bewegt.

Der Block wird in einer horizontalen Position eingespannt und der Hubvorschub auf 10 µm eingestellt. Beim Schneidevorgang wird das Mikrotom und der Block für eine bessere Schnittqualität mit Hilfe eines Pinsels mit Schneideflüssigkeit bestrichen. Abweichungen von der gewünschten Schnittebene des eingespannten Blocks können über Justierschrauben korrigiert werden. Ist man in der gewünschten Ebene der Tibia angekommen, reduziert man den Hubvorschub auf 6 µm.

Die Schnitte werden vorsichtig mit einer Pinzette auf die Objektträger gelegt, mit Streckflüssigkeit beträufelt und mit zwei weichen Pinseln vorsichtig faltenfrei gezogen. Dann werden die Präparate mit einer Kisolfolie bedeckt. Die Objektträger werden mit Filterpapier dazwischen, welches die überschüssige Flüssigkeit aufsaugt, übereinander gestapelt und für 2 Tage bei 37° C gepresst. Dieses Vorgehen sorgt für eine gute Haftung am Objektträger.

2.10 Färben der histologischen Schnitte

2.10.1 Allgemeines und Vorbehandlung

- (2-Methoxyethyl)-Acetat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland)
- Ethanol (100 %, 96 %, 80 %, 60 %, 40 %)
- Destilliertes Wasser

Bei der histologischen Färbung werden den Schnitten auf den Objektträgern Farbstoffe in Lösungen angeboten, die an bestimmte Strukturen im Gewebe binden. Die Färbung beeinflussende Faktoren sind die Konzentration der Farbstofflösung, die Temperatur der Lösungen, die Färbezeit und die Schnittdicke der Präparate.

Bevor mit der Färbung begonnen werden kann, werden die Präparate entplastet (Siehe Tabelle 3). Nach Entfernung der Kisolfolie folgen Bäder in (2-Methoxyethyl)-Acetat. Anschließend werden die Präparate in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Zuletzt erfolgt ein Bad in destilliertem Wasser. Anschließend kann eine histologische Färbung durchgeführt werden.

Tabelle 3: Schema zur Entplastung der histologischen Schnitte

3 x 30 Minuten	(2-Methoxyethyl)-Acetat
Rehydratation (Teil 1)	Ethanol 100 %, 96 %, 80 %, 60 %, 40 %
Rehydratation (Teil 2)	Destilliertes Wasser

2.10.2 Versilberung nach von Kossa:

- Küvetten
- Silbernitratlösung 3 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Destilliertes Wasser
- Natrium-Formaldehydlösung, mind. 37 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumthiosulfat 5 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (70 %, 80 %, 96 %, 100 %)
- Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Vitro clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Die Färbung nach von Kossa dient der Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe sowie den Mineralisationsfronten. Diese zeigen sich nach der Versilberung schwarz. Das restliche Gewebe stellt sich braun dar (Siehe Abbildung 11).



Abbildung 11: Färbung nach von Kossa einer Tibia. Mineralisiertes Knochen- und Knorpelgewebe stellt sich schwarz dar. Das restliche Gewebe stellt sich braun dar. Deutlich sichtbar sind der Kallus und der Bereich, wo der Marknagel sich befand.

Nach der Vorbehandlung (Siehe 2.10.1) wird das Präparat mit den Objektträgern in Küvetten mit vorbereiteten Chemikalien nach dem Schema in Tabelle 4 gefärbt und am Ende mit Vitro clud versiegelt.

Tabelle 4: Schema zur Versilberung nach von Kossa

5 Minuten	Silbernitratlösung 3 %
3 x spülen	Destilliertes Wasser
2 Minuten	Natrium-Formaldehydlösung (mind. 37 %)
10 Minuten spülen	Leitungswasser
5 Minuten	Natriumthiosulfat 5 %
10 Minuten spülen	Leitungswasser
5 Minuten	Natriumthiosulfat 5 %
10 Minuten spülen	Leitungswasser
Kurzes Spülen	Destilliertes Wasser
Entwässerung	Ethanol 70 %, 80 %, 96 %, 100 %
10 Minuten	Xylol
Versiegelung	Vitro clud

2.10.3 Safranin O/Lichtgrün-Färbung

- Küvetten
- Safranin O (1 %), Certistain[®] (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Destilliertes Wasser
- Pikrinsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland, Mischverhältnis: 100 g + 50 ml H₂O)
- Essigsäure 1 % (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Lichtgrün (CHROMA-Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Köngen, Deutschland)
- Ethanol 100 %
- Xylol (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Vitro clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Die Färbung mit Safranin O/Lichtgrün dient der Darstellung von Knorpelgewebe. Dieses zeigt sich nach der Färbung in tiefem rot. Binde- und Knochengewebe zeigt sich grün bis türkis (Siehe Abbildung 12).

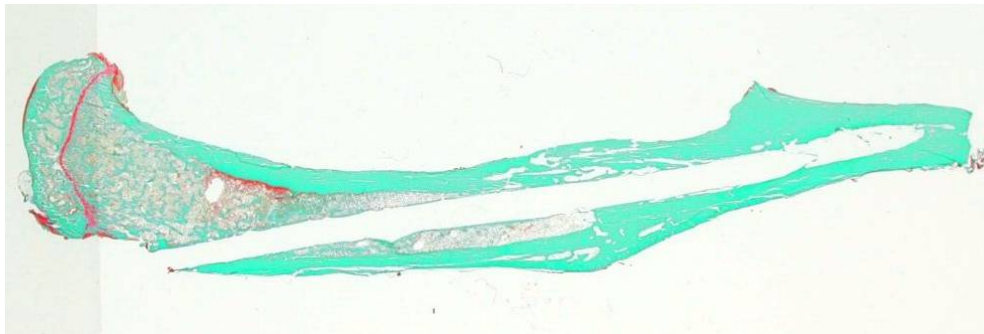


Abbildung 12: Färbung mit Safranin O/Lichtgrün. Knochen- und Bindegewebe stellt sich grün dar. Knorpelgewebe stellt sich rot dar.

Nach der Vorbehandlung (Siehe 2.10.1) wird das Präparat mit den Objektträgern in Küvetten mit vorbereiteten Chemikalien nach dem Schema in Tabelle 5 gefärbt und am Ende mit Vitro clud versiegelt.

Tabelle 5: Schema zur Färbung mit Safranin O/Lichtgrün

8 bis 10 Minuten	Safranin O
Kurzes Spülen	Destilliertes Wasser
10 Minuten	Pikrinsäure
Kurzes Spülen	Destilliertes Wasser
Kurzes Spülen	Essigsäure 1 %
8 bis 10 Minuten	Lichtgrün
Kurzes Spülen	Essigsäure 1 %
Kurzes Spülen	Ethanol 100 %
10 Minuten	Xylol
Versiegelung	Vitro clud

2.11 Histomorphologische/-morphometrische Analyse

- Mikroskop Leica DM R (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- 1,6-fach vergrößerndes Objektiv
- Kamera (Sony 3CCD Color Video Camera, AVT Horn, MC 3254, Japan)
- Bildanalysesystem Zeiss KS 400 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland)

Zur histomorphometrischen Auswertung wird das Mikroskop Leica DM R mit dem 1,6-fach vergrößernden Objektiv benutzt. Dieses Mikroskop ist an eine Kamera angeschlossen, die wiederum an einen Computer angeschlossen ist. Die Bilddaten, die von der Kamera geliefert werden, werden im Computer vom Bildanalysesystem Zeiss KS 400 bearbeitet. Mit diesem Bildverarbeitungsprogramm können die Bilder der Präparate histomorphologisch und histomorphometrisch ausgewertet werden.

Folgende Parameter werden zur Analyse gemessen:

Tibiadurchmesser (Baseline)

Kortikalis: Gesamtfläche, Knochenfläche, Dichte (Knochen/Fläche)

Periostaler Kallus: Gesamtfläche, Knochenfläche, Dichte

Endostaler Kallus: Fläche, Knochen, Dichte

Knorpelfläche: Gesamtfläche, periostaler Anteil, endostaler Anteil

Am Mikroskop muss das Objektiv 1,6 mm und der Zoomfaktor 0,5 eingestellt sein. Das System wird mit einem Objektträger, auf dem 5 mm angegeben sind, geeicht, um die Messungen präzise vergleichen zu können.

Die Knorpelfläche wird an den Präparaten bestimmt, die mit Safranin O/Lichtgrün gefärbt worden sind. Die restlichen Parameter werden an den Präparaten mit der von Kossa-Färbung bestimmt. Das Procedere wird im Folgenden erläutert:

Zunächst wird der Tibiadurchmesser am Frakturspalt bestimmt (Siehe Abbildung 13, rote Linie), der definitionsgemäß von der Außenseite der ventralen Kortikalis zur Außenseite der dorsalen Kortikalis verläuft. Dies ist wichtig, weil alle anderen Parameter nur in einer bestimmten „region of interest“ (ROI) gemessen werden, die vom Tibiadurchmesser abhängt.

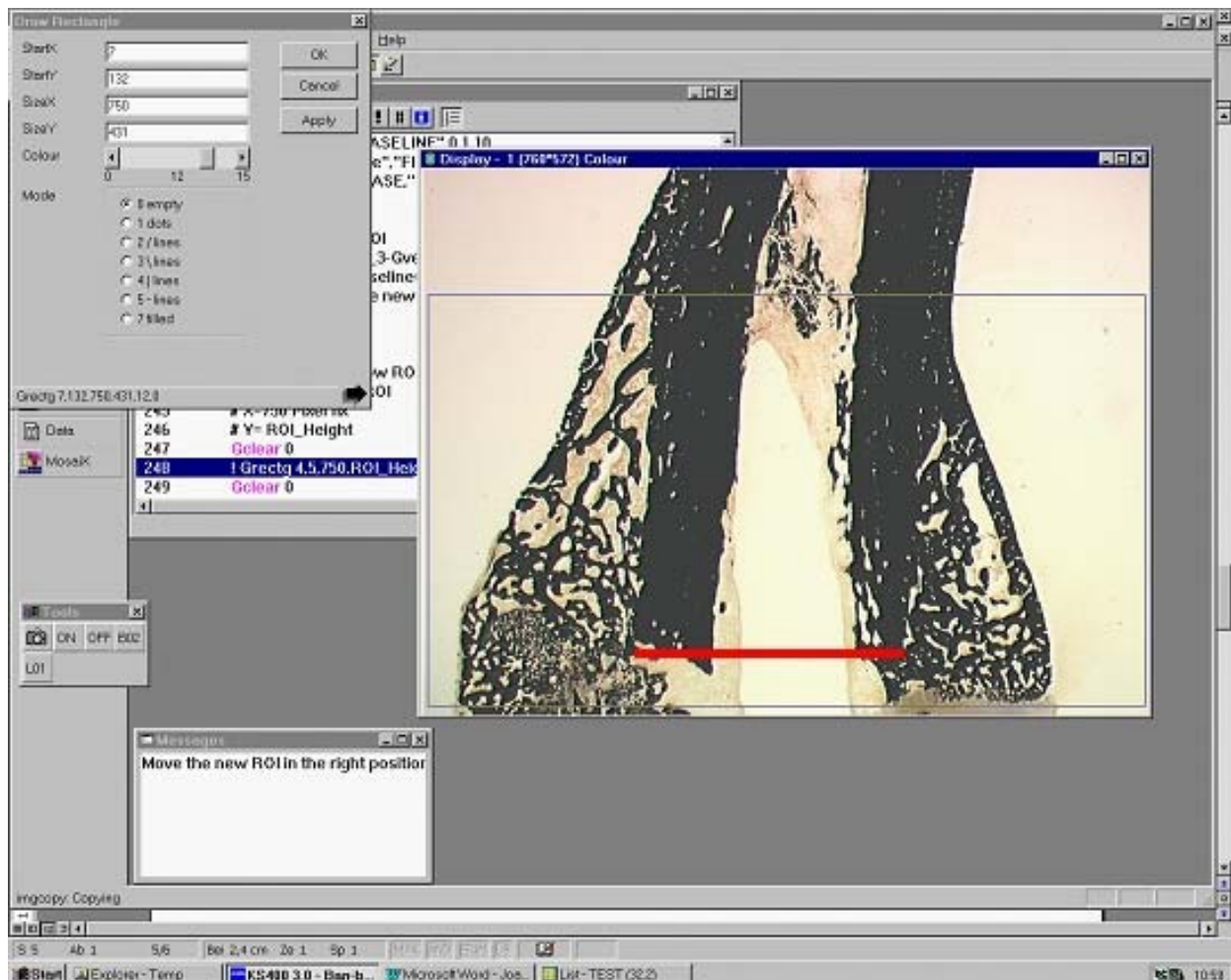


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer distalen Tibia (von Kossa-Färbung) im Bildanalyseprogramm. Die rote Linie markiert den Tibiadurchmesser, der graue Rahmen im Ausschnitt zeigt die ROI der distalen Hälfte an. (Das Beispielbild ist nicht Bestandteil dieser Arbeit)

Die ROI wird als 1,5-fache Länge des Tibiadurchmessers nach jeweils distal und proximal definiert. In der Breite befindet sich der Kallus immer vollständig in der ROI. Die ROI wird standardmäßig zuerst vom Frakturspalt nach distal und dann nach proximal bestimmt.

Im nächsten Schritt wird die Kortikalisfläche bestimmt (Siehe Abbildung 14). Mit Hilfe der „Image-Edit-Tool-Box“ wird die distale Kortikalis mit der Maus umrandet (Polygon, Stift der Markierungsstärke 2, neongrün). Die Software berechnet dann die Fläche und die mineralisierten Anteile. In gleicher Weise verfährt man mit dem periostalen und dem endostalen Kallus. Wieder werden jeweils die Fläche und der mineralisierte Anteil von der Software berechnet. Analog dazu verfährt man dann mit dem proximalen Anteil der Tibia. Zum Schluss werden die Werte vom proximalen und distalen Teil addiert und die Anteile neu berechnet.

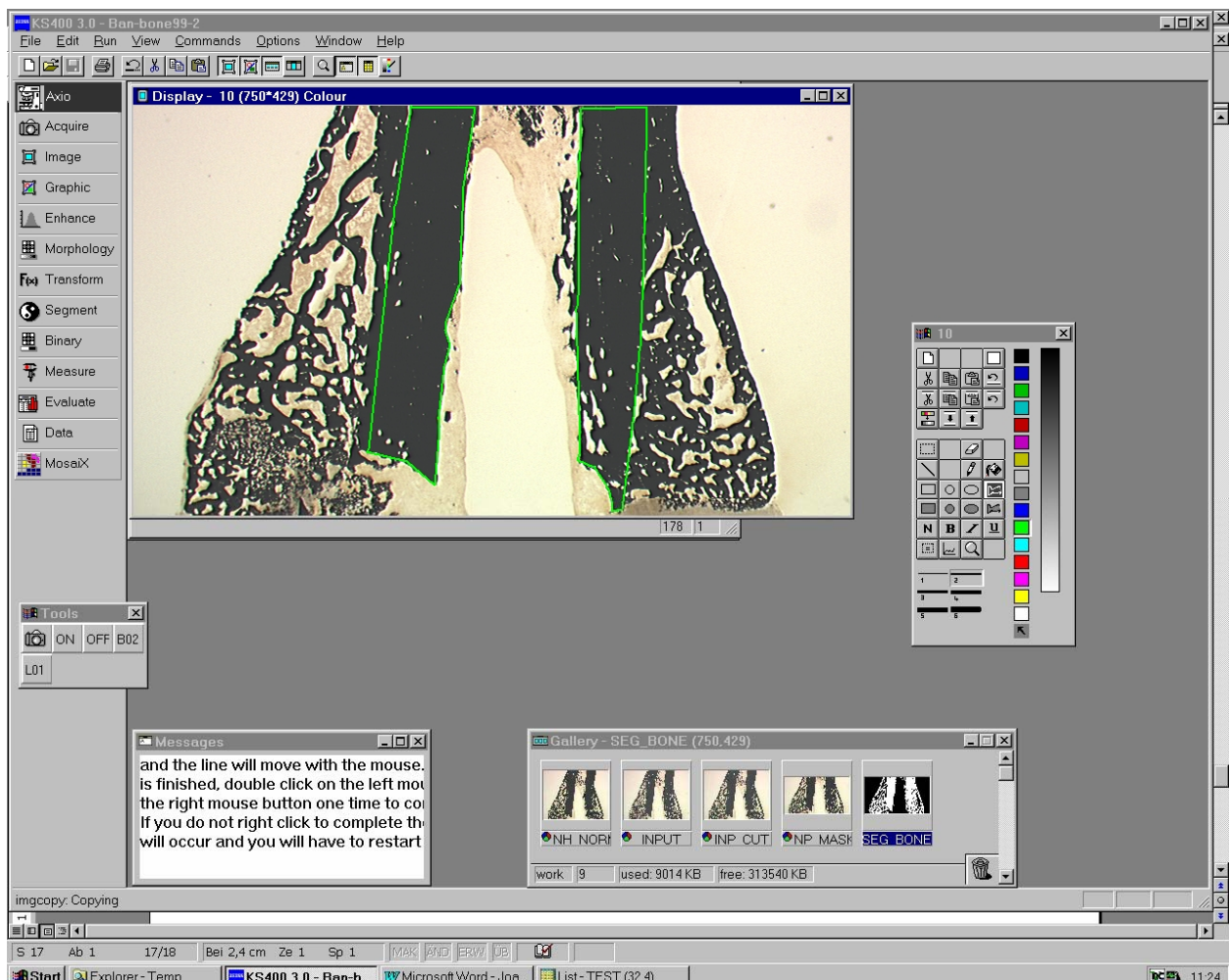


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer distalen Tibia (von Kossa-Färbung) im Bildanalyseprogramm. Die distale Kortikalis wurde in neongrün umrandet zur Berechnung von Fläche und Mineralisation. (Das Beispielbild ist nicht Bestandteil dieser Arbeit)

Zur Bestimmung der Knorpelflächen bedient man sich der Safranin O/Lichtgrün – gefärbten Schnitte. Die roten Knorpelanteile werden mit Hilfe des Programms markiert (Siehe Abbildung 15). Eventuelle Gewebereste, die auch rot gefärbt sind, werden durch manuelle digitale Entfernung subtrahiert. Die Knorpelfläche und ihre Anteile in den einzelnen Kallusbereichen berechnet das Analyseprogramm innerhalb der ROI.

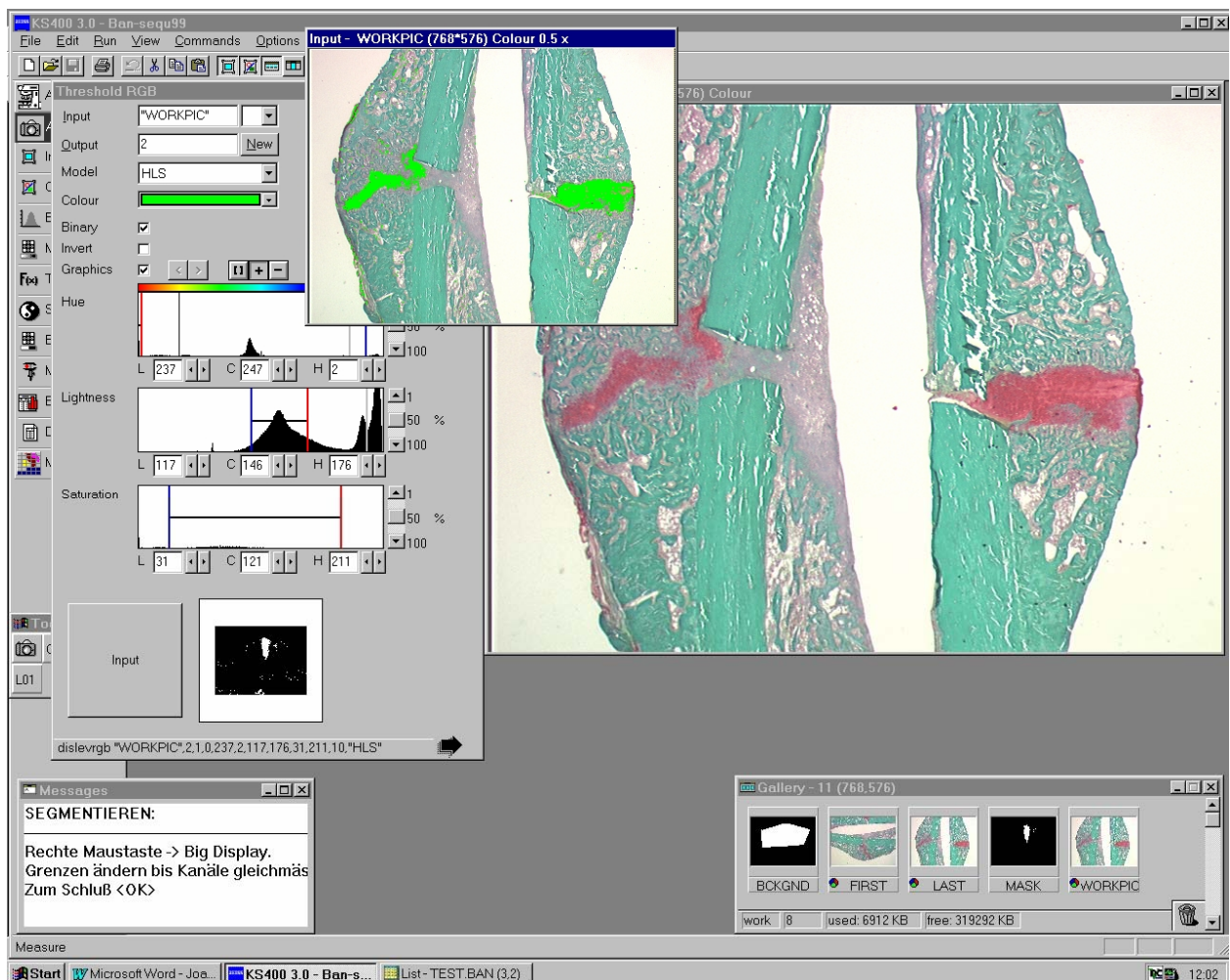


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Tibia (Safranin O/Lichtgrün-Färbung) im Bildanalyseprogramm. Die roten Knorpelanteile werden von der Software automatisch in neongrün gefärbt. (Das Beispielbild ist nicht Bestandteil dieser Arbeit)

2.12 Auswertung der radiologischen Kontrollen

Die operierten Ratten werden postoperativ zur Lagekontrolle des Kirschnerdrahtes in zwei Ebenen geröntgt. Weitere Röntgenkontrollen erfolgen 4, 6, 8 und 12 Wochen nach der Operation.

Die Röntgenbilder vom Tötungstag (12 Wochen nach OP) werden dann von zwei Personen unabhängig bewertet. Bewertet wird die radiologische Konsolidierung der Fraktur nach folgenden Scoreparametern:

[A] = komplette Konsolidierung (Knöcherner Überbrückung aller vier Kortizes)

[B] = inkomplette Konsolidierung (Knöcherner Überbrückung von 1 bis 3 Kortizes)

[C] = keine Konsolidierung

2.13 Statistik

- Statistikprogramm SPSS (SPSS 10.0, Inc., Chicago, USA)

Die Tiere werden zufällig den drei Gruppen (Kontrollgruppe, PDLLA-beschichtete Gruppe, PDLLA + IGF-I + TGF- β 1) und den beiden Untersuchungsmethoden (Biomechanik und Histologie) zugeteilt. Die Ergebnisse werden mittels der Varianz-Analyse (ANOVA) und mittels des Bonferroni-Tests für unabhängige Werte verglichen. Die radiologischen Scores werden mit dem chi-quadrat Test analysiert. Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Ausfälle

Die Injektionsnarkose und die Operation wurden von den Ratten insgesamt sehr gut vertragen. Ein Tier starb während der Anästhesie am Operationstag aufgrund einer zu hohen Dosis des Narkotikums. Dieses Tier wurde ersetzt.

Aufgrund von Marknagelwanderung, dislozierten Frakturrenden bzw. grober Fehlstellung der unteren Extremität wurden in der Gruppe der biomechanisch zu testenden Ratten fünf Tiere aus der Wertung genommen und ersetzt, so dass die Anzahl von n=10 in jeder Gruppe unverändert blieb (Siehe Tabelle 6).

In der Gruppe der histomorphologisch/-morphometrisch zu untersuchenden Ratten sind vier Tiere ersatzlos aus der Wertung genommen. Ein Tier aus der Kontrollgruppe konnte wegen technischer Schwierigkeiten bei der Präparation nicht verwertet werden und jeweils ein Tier aus jeder Gruppe zeigte im Verlauf eine Frakturspaltvergrößerung im Sinne einer Dislokation (Siehe Tabelle 7).

Tabelle 6: Ausfälle in der Gruppe der biomechanisch zu untersuchenden Ratten

	Kontrollgruppe	PDLLA	IGF-I und TGF-β1
Biomechanik	n=10	n=10	n=10
Ausfälle	2	1	2
Ersatz	Ja	Ja	Ja
Wertung	n=10	n=10	n=10

Tabelle 7: Ausfälle in der Gruppe der histomorphologisch/-morphometrisch zu untersuchenden Ratten

	Kontrollgruppe	PDLLA	IGF-I und TGF-β1
Histomorph.	n=10	n=10	n=10
Ausfälle	2	1	1
Ersatz	Nein	Nein	Nein
Wertung	n=8	n=9	n=9

3.2 *Gewicht und Temperatur*

Alle Tiere nahmen im Verlauf der Untersuchungen an Gewicht zu. Es gab keine Anzeichen für unregelmäßige oder unverhältnismäßige Gewichtsveränderungen (Siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Gewicht [g] der Ratten im Verlauf

	Tag 0, präop.	4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
Kontrolle	276 ± 12	284 ± 13	292 ± 11	297 ± 15	312 ± 14
PDLLA	272 ± 10	278 ± 11	292 ± 13	293 ± 15	299 ± 16
IGF-I + TGF-β1	269 ± 12	280 ± 14	286 ± 14	292 ± 12	305 ± 17

Die Körpertemperatur wies nur kleine Schwankungen auf. Es gab keine Anzeichen auf eine Infektion mit einhergehender Temperaturerhöhung (Siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Temperatur [° C] der Ratten im Verlauf

	Tag 0, präop.	4 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	12 Wochen
Kontrolle	37,2 ± 0,7	37,4 ± 0,5	37,4 ± 0,5	37,6 ± 0,4	37,4 ± 0,5
PDLLA	37,0 ± 0,6	37,2 ± 0,5	37,5 ± 0,4	37,8 ± 0,3	37,7 ± 0,4
IGF-I + TGF-β1	37,1 ± 0,5	37,0 ± 0,8	37,5 ± 0,4	37,3 ± 0,5	37,5 ± 0,4

3.3 Radiologische Untersuchung

3.3.1 Verlauf

Am Tag 0 wurden postoperativ zur Lagekontrolle des Kirschnerdrahtes eine laterale und eine posterior-anteriore Röntgenaufnahme angefertigt. Weitere Aufnahmen erfolgten nach 4, 6, 8 und 12 Wochen (Tötungstag).

In Abbildung 16 ist exemplarisch der radiologische Verlauf der Heilung einer Tibia aus der Kontrollgruppe dargestellt. Das Bild ganz links wurde postoperativ zur Lagekontrolle des Kirschnerdrahtes gemacht. Die Fraktur ist mittig gesetzt und der Draht ist korrekt positioniert worden.



Abbildung 16: Ratte aus der Kontrollgruppe. Laterale Röntgenbilder vom OP-Tag, 4, 6, 8 und 12 Wochen nach der OP (von links nach rechts).

Nach 4 Wochen (zweites Bild von links) ist ein Kallus erkennbar. Der Frakturspalt ist deutlich vorhanden und nicht konsolidiert. Insgesamt wirkt der Bereich der Fraktur noch unregelmäßig. 6 Wochen postoperativ (mittleres Bild) ist das Röntgenbild leicht verändert. Der Kallus wirkt abgerundeter und es zeichnet sich eine beginnende knöcherne Durchbauung ab. 8 Wochen nach der OP (drittes Bild von links) hat sich der Frakturspalt der Tibia verkleinert. Es ist zu einer weit fortgeschrittenen aber noch inkompletten Konsolidierung mit knöcherner Überbrückung gekommen. Auf dem letzten Bild zeigt sich die komplette Konsolidierung der Fraktur, also eine knöcherne Überbrückung aller vier Kortizes der Tibia. Lediglich bei der Fibula fehlt die Konsolidierung. Der Kallus ist auch 12 Wochen postoperativ deutlich zu erkennen.

Ein ähnliches morphologisches Bild im Röntgenverlauf zeigt sich im Beispiel aus der PDLLA-Gruppe (Siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Ratte aus der PDLLA-Gruppe. Laterale Röntgenbilder vom OP-Tag, 4, 6, 8 und 12 Wochen nach der OP (von links nach rechts).

Im Vergleich dazu tritt die Durchbauung im Beispiel aus der WF-Gruppe früher auf (Siehe Abbildung 18). Bereits nach 6 Wochen sind alle vier Kortizes der Tibia knöchern überbrückt.

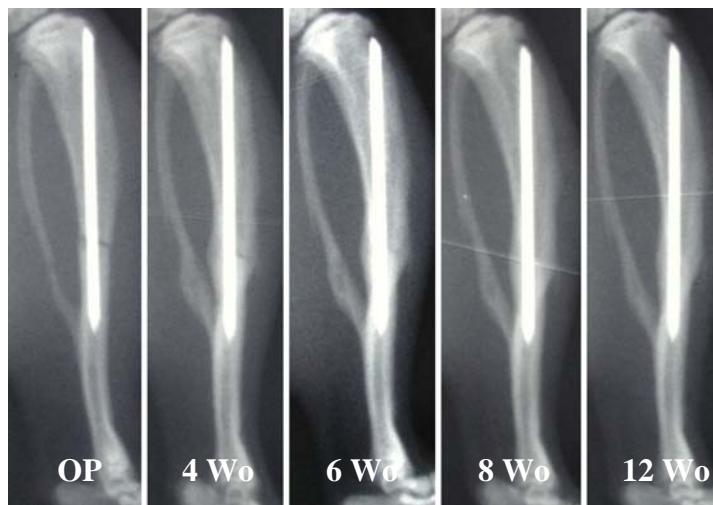


Abbildung 18: Ratte aus der WF-Gruppe. Laterale Röntgenbilder vom OP-Tag, 4, 6, 8 und 12 Wochen nach der OP (von links nach rechts).

3.3.2 Radiologische Auswertung

Von zwei unabhängigen Beobachtern wurden die Röntgenbilder nach folgenden Kriterien beurteilt:

- [A] = komplette Konsolidierung (Knöcherne Überbrückung aller vier Kortizes)
- [B] = inkomplette Konsolidierung (Knöcherne Überbrückung von 1 bis 3 Kortizes)
- [C] = keine Konsolidierung

In Abbildung 19 ist exemplarisch von jeder Gruppe das Röntgenbild einer frakturierten Tibia zwölf Wochen nach der Operation dargestellt.

Im Verlauf haben die Röntgenbilder gezeigt, dass es Unterschiede in der Konsolidierung zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach der Operation zwischen den Gruppen gab. Die WF-Gruppe konsolidierte schneller als die PDLLA-Gruppe, die wiederum schneller als die Kontrollgruppe konsolidierte (Siehe Tabelle 10 und 11). Zum Tötungszeitpunkt 12 Wochen nach OP waren aber keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen feststellbar. Da das Interesse dem Zeitpunkt 12 Wochen postoperativ galt, wurden die Zeitpunkte 4 und 6 Wochen postoperativ statistisch nicht ausgewertet.



Abbildung 19: Röntgenbilder 12 Wochen nach OP. Links: Kontrollgruppe. Mitte: PDLLA-Gruppe. Rechts: WF-Gruppe.

Tabelle 10: Radiologische Auswertung nach 4 Wochen

Konsolidierung	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF- β 1
Komplett [A]	1	2	6
Inkomplett [B]	10	12	11
Keine [C]	7	4	1

Tabelle 11: Radiologische Auswertung nach 6 Wochen

Konsolidierung	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF- β 1
Komplett [A]	11	12	13
Inkomplett [B]	7	5	5
Keine [C]	0	1	0

Bei allen Frakturen fand 12 Wochen postoperativ eine knöchernen Überbrückung aller vier Kortizes statt, und ein Kallus war noch detektierbar. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der radiologischen Auswertung aufgelistet. Aufgrund der oben beschriebenen Ausfälle (Siehe 3.1) und zusätzlich technischer Schwierigkeiten standen für die Auswertung aus jeder Gruppe nur 18 Tiere zur Verfügung.

Tabelle 12: Radiologische Auswertung nach 12 Wochen

Konsolidierung	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF- β 1
Komplett [A]	18	18	18
Inkomplett [B]	0	0	0
Keine [C]	0	0	0

3.4 Biomechanische Testung

Nach der Tötung der Tiere wurden beide Tibiae freipräpariert. 12 Wochen postoperativ waren die Kirschnerdrähte stark verwachsen, so dass erst 1 bis 2 mm von der Oberfläche freipräpariert werden musste, damit mit einer Faszange der Draht gefasst werden konnte. Zusätzlich wurde der Titankirschnerdraht intramedullär durch drehende Bewegungen gelockert, bevor er in axialer Richtung herausgezogen werden konnte.

Die Inspektion der Tibiae zeigte makroskopisch keine gruppenspezifischen Unterschiede zwischen den Gruppen (Kontrolle, PDLLA, WF). Anschließend erfolgten die Messungen der biomechanischen Testung wie in Kapitel 2.7 beschrieben.

Die bei der biomechanischen Messung verursachten Frakturen waren variantenreich. Es zeigten sich keine spezifischen Tendenzen in Richtung Lokalisation distal oder proximal der alten Fraktur. Auch Refrakturen im Sinne einer Querfraktur durch die alte Bruchstelle wurden nicht beobachtet. Es fielen lediglich häufige Spiralfrakturen durch den Kallusbereich auf.

In Abbildung 20 erkennt man die Messungen der Tibiae einer Ratte aus der Kontrollgruppe. Das maximale Drehmoment der frakturierten Tibia, das dem höchsten Punkt der Kurve entspricht, liegt bei 240 Nmm, das der nicht frakturierten Gegenseite bei 145 Nmm.

Die Steifigkeit, die der Steigung der Kurve entspricht, liegt bei der frakturierten Seite bei 31,2 Nmm/° und bei der Gegenseite bei 16,7 Nmm/°.

Es wurden die Tibiae von 10 Ratten jeweils in der Kontrollgruppe, in der PDLLA-Gruppe und in der WF-Gruppe biomechanisch untersucht.

In der Kontrollgruppe wurden absolute Werte für maximales Drehmoment zwischen 193 und 345 Nmm für die frakturierte Tibia gemessen. Der Mittelwert liegt bei 251 Nmm mit einer Standardabweichung von +/- 37,8. Für die nicht frakturierte Gegenseite wurden Werte zwischen 97 und 250 Nmm mit einem Mittelwert von 164 +/- 47,7 Nmm ermittelt.

Die Steifigkeit bei den frakturierten Tibiae lag zwischen 21,3 und 52,0 Nmm/° (Mittelwert: 35,3 +/- 9,3 Nmm/°), bei den nicht frakturierten Tibiae zwischen 15,7 und 34,5 Nmm/° (Mittelwert: 23,9 +/- 5,3 Nmm/°).

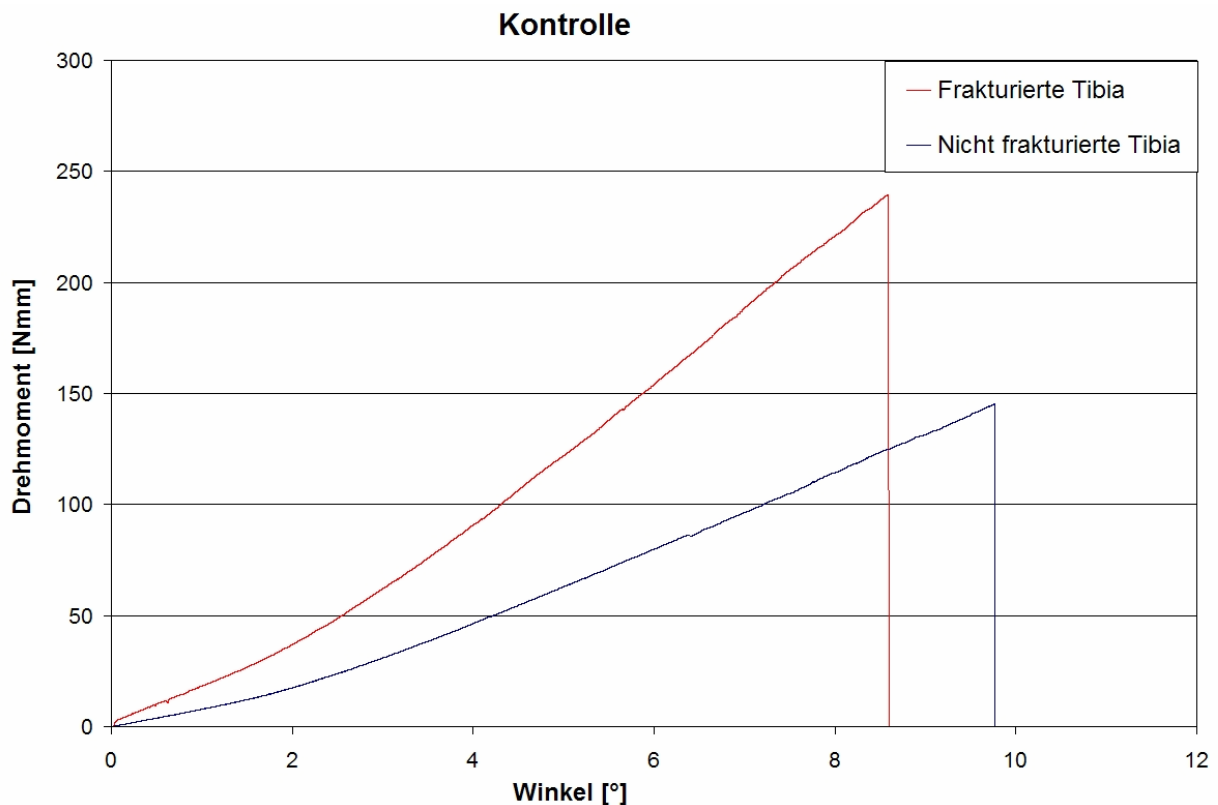


Abbildung 20: Messungen der Tibiae einer Ratte aus der Kontrollgruppe. Maximales Drehmoment: 240 Nmm frakt. Tibia, 145 Nmm nicht frakt. Tibia, 166 % frakt./nicht frakt. (*100). Steifigkeit: 31,2 Nmm/° frakt. Tibia, 16,7 Nmm/° nicht frakt. Tibia, 187 % frakt./nicht frakt. (*100).

In der PDLLA-Gruppe wurden Werte für maximales Drehmoment zwischen 103 und 291 Nmm für die frakturierte Tibia mit einem Mittelwert von 216 +/- 56,2 Nmm gemessen. Für die gesunde Gegenseite wurden Werte zwischen 88 und 215 Nmm mit einem Mittelwert von 150 +/- 41,2 Nmm ermittelt.

Die Steifigkeit bei den frakturierten Tibiae lag zwischen 20,7 und 46,8 Nmm/° (Mittelwert: 34,0 +/- 6,8 Nmm/°), bei den nicht frakturierten Tibiae zwischen 17,6 und 31,7 Nmm/° (Mittelwert: 23,4 +/- 4,8 Nmm/°).

In der WF-Gruppe wurden Werte für maximales Drehmoment zwischen 152 und 304 Nmm für die operierte Tibia mit einem Mittelwert von 233 +/- 44,8 Nmm gemessen. Für die Gegenseite wurden Werte zwischen 125 und 216 Nmm mit einem arithmetischen Mittel von 162 +/- 24,7 Nmm ermittelt.

Die Steifigkeit bei den frakturierten Tibiae lag zwischen 21,3 und 41,1 Nmm/° (Mittelwert: 33,0 +/- 7,0 Nmm/°), bei den nicht frakturierten Tibiae zwischen 12,6 und 28,1 Nmm/° (Mittelwert: 21,8 +/- 5,3 Nmm/°).

Um den individuellen Unterschieden der Ratten gerecht zu werden, werden die biomechanischen Ergebnisse der frakturierten Tibia mit den Ergebnissen der gesunden Tibia verglichen. Man teilt das Ergebnis der frakturierten Seite durch das der gesunden Seite und multipliziert mit 100, um ein Prozentergebnis zu erhalten:

$$(\text{frakturiert/gesund}) \cdot 100 \%$$

Im maximalen Drehmoment lagen die Werte der frakturierten Tibiae um circa 50 % über denen der unfrakturierten Gegenseite ohne signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Siehe Abbildung 21).

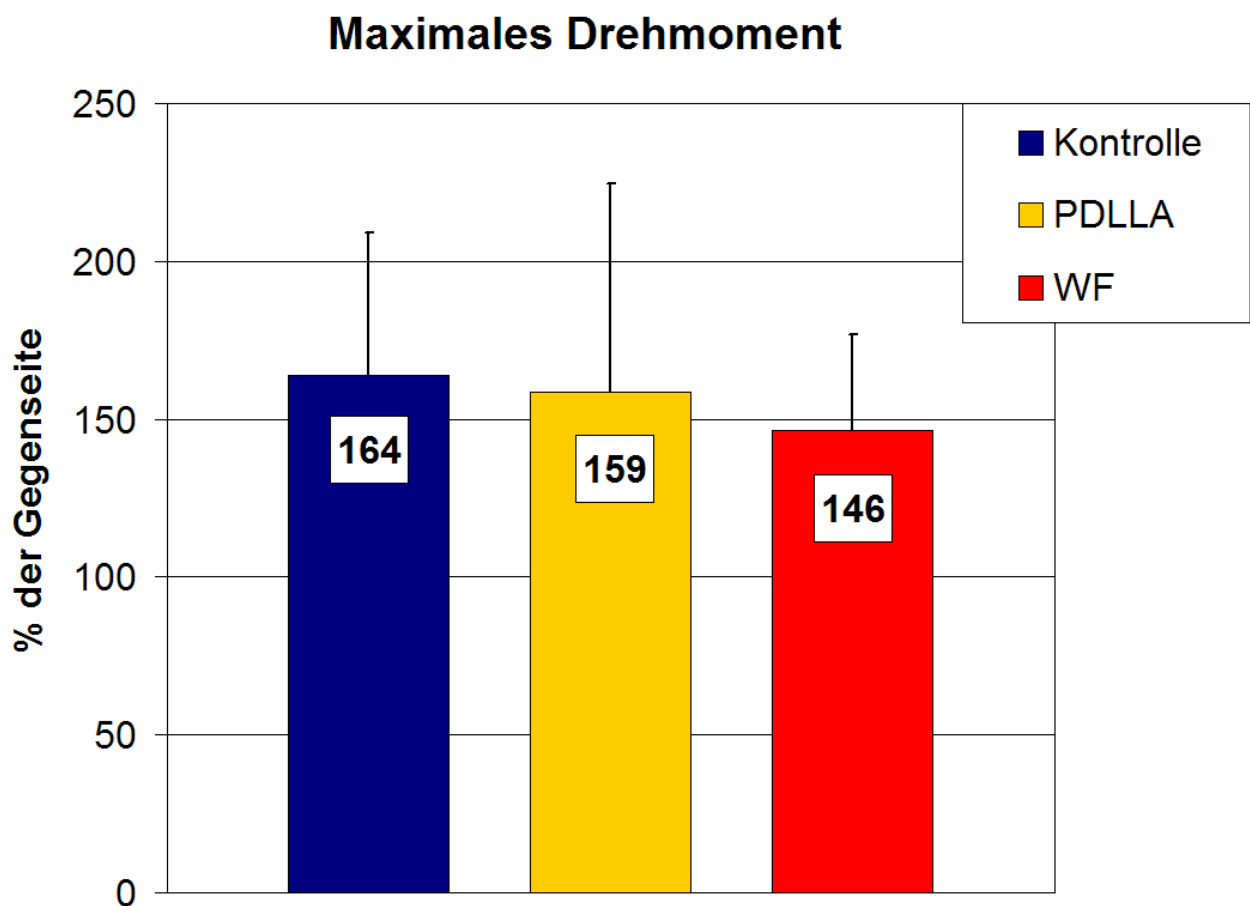


Abbildung 21: Maximales Drehmoment: Die Kontrollgruppe zeigte das höchste maximale Drehmoment mit 164 % +/- 45 %, gefolgt von der PDLLA-Gruppe (159 % +/- 66 %) und der WF-Gruppe (146 % +/- 31 %). Die Ergebnisse sind nicht signifikant verschieden zueinander.

Bei der torsionalen Steifigkeit verhält es sich ähnlich. Die Werte der frakturierten Tibiae liegen um circa 50 % über denen der unfrakturierten Gegenseite ohne signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Siehe Abbildung 22).

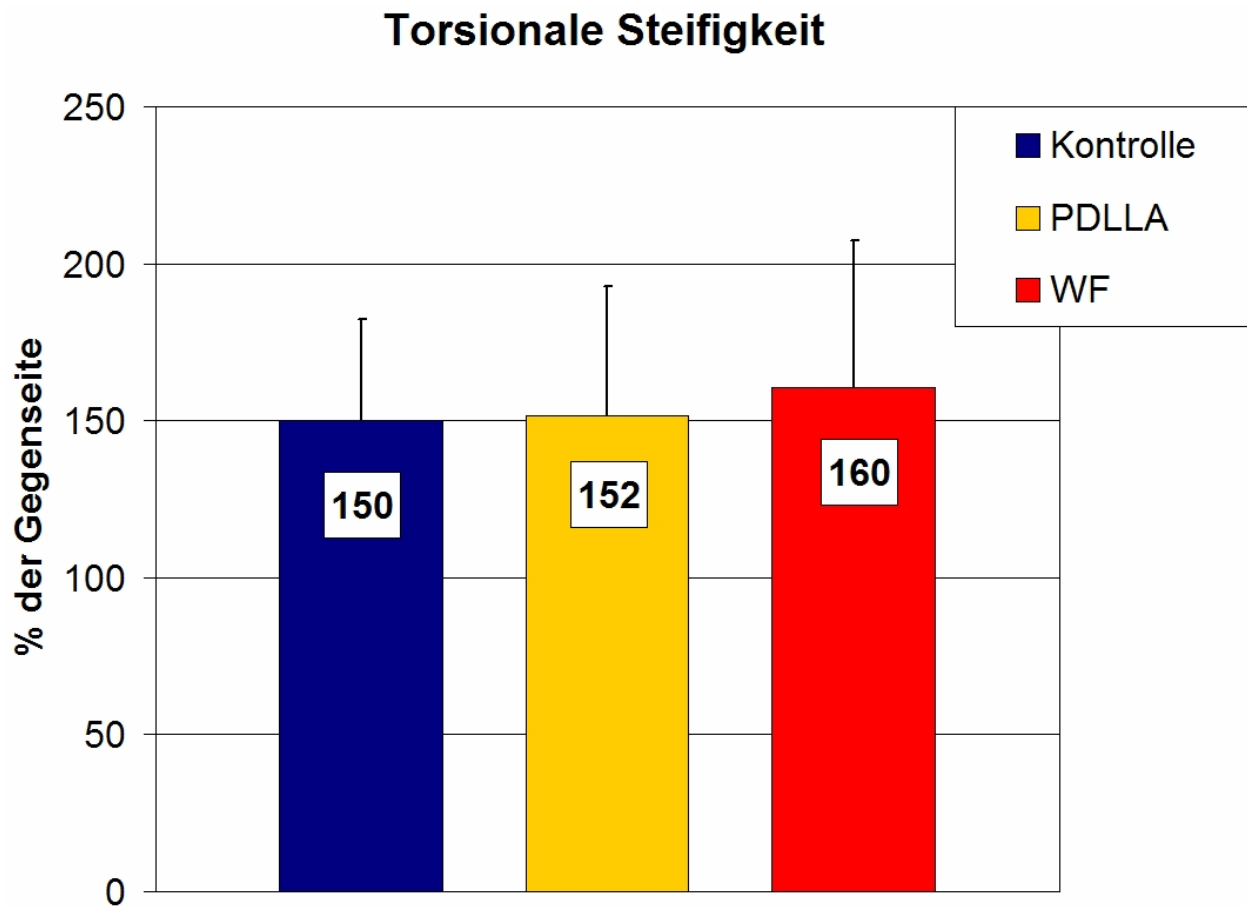


Abbildung 22: Torsionale Steifigkeit: Die höchste torsionale Steifigkeit zeigte die WF-Gruppe mit 160 % +/- 47 %, gefolgt von der PDLLA-Gruppe (152 % +/- 41 %) und der Kontrollgruppe (150 % +/- 32 %). Die Ergebnisse sind nicht signifikant verschieden zueinander.

Die Resultate der biomechanischen Testung waren sowohl bei der Steifigkeit als auch beim maximalen Drehmoment nicht signifikant verschieden zueinander ($p > 0,05$; ANOVA).

3.5 Histomorphologische und histomorphometrische Analyse

Nach der Tötung der Tiere wurde die frakturierte Tibia freipräpariert. Ähnlich wie bei den Tieren für die Biomechanik war der Marknagel stark verwachsen, so dass 1 bis 2 mm des Titankirschnerdrahtes von den Verwachsungen befreit werden mussten, bevor man mit der Faszange zugreifen konnte und unter drehenden Bewegungen das Implantat in axialer Richtung entfernen konnte. Am Implantat fielen keine Besonderheiten auf. Der intramedulläre Teil des Drahtes war frei von Gewebe und Verwachsungen.

Für die Bildanalyse wurden zwei Färbungen angefertigt. Die Safranin O/Lichtgrün-Färbung und die Versilberung nach von Kossa.

Die Färbung nach von Kossa dient der Darstellung von mineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe sowie den Mineralisationsfronten. Diese zeigen sich nach der Versilberung schwarz. Das restliche Gewebe stellt sich braun dar.

Die Färbung mit Safranin O/Lichtgrün dient der Darstellung von Knorpelgewebe. Dieses zeigt sich nach der Färbung in tiefem rot. Binde- und Knochengewebe zeigt sich grün bis türkis.

Für die histologischen Präparate wurde ein axialer Sagitalschnitt aus der Kallusmitte ausgewählt, auf dem die operativ angelegte Öffnung zum Markkanal, der gesamte Markkanal und der Kallus in seiner größten Ausdehnung zu sehen sind.

In Abbildung 23-25 ist repräsentativ für jede Gruppe jeweils eine Tibia in beiden Färbungen dargestellt. In der linken Bildhälfte ist die Tibia vollständig dargestellt. In der rechten Bildhälfte wird der Bereich des Kallus vergrößert dargestellt.

Der Eintrittspunkt des Markkanals lokalisiert sich in allen Gruppen einheitlich, so dass keine gruppenspezifischen Unterschiede feststellbar sind. Außerdem kommt hinzu, dass durch die Präparation des Kirschnerdrahtes aus den Verwachsungen ohnehin eine Aussage erschwert wird. Im Markkanal der Tibiae ist in allen Gruppen deutlich die Spur sichtbar, die der Marknagel hinterlassen hat, die sich durch fehlendes Gewebe darstellt. Teilweise kann man sogar in der Abbildung den spitzzulaufenden Gewebesaum erkennen, der den Nagel an der Spitze umgab.

Die radiologisch festgestellte Konsolidierung der Fraktur mit vollständiger knöcherner Überbrückung konnte histologisch bestätigt werden. Es fand sich bei keinem Tier ein Frakturspalt.

Der radiologisch festgestellte Kallus ist auch histologisch bei allen Tieren gut erkennbar. Bei manchen Tibiae waren die Umbauprozesse des Kallus so weit fortgeschritten, dass die genaue Ausdehnung makroskopisch nicht mehr genau festgelegt werden konnte. Unter dem Mikroskop konnte man die Ausdehnung präzisieren, da die unterschiedliche Struktur von Kortex- und Kallusgewebe erst dann erkennbar wurde. Es fanden sich weder pathophysiologische Veränderungen distal und proximal des Kallus, noch wurden Osteolysen oder andere reaktive Prozesse registriert.

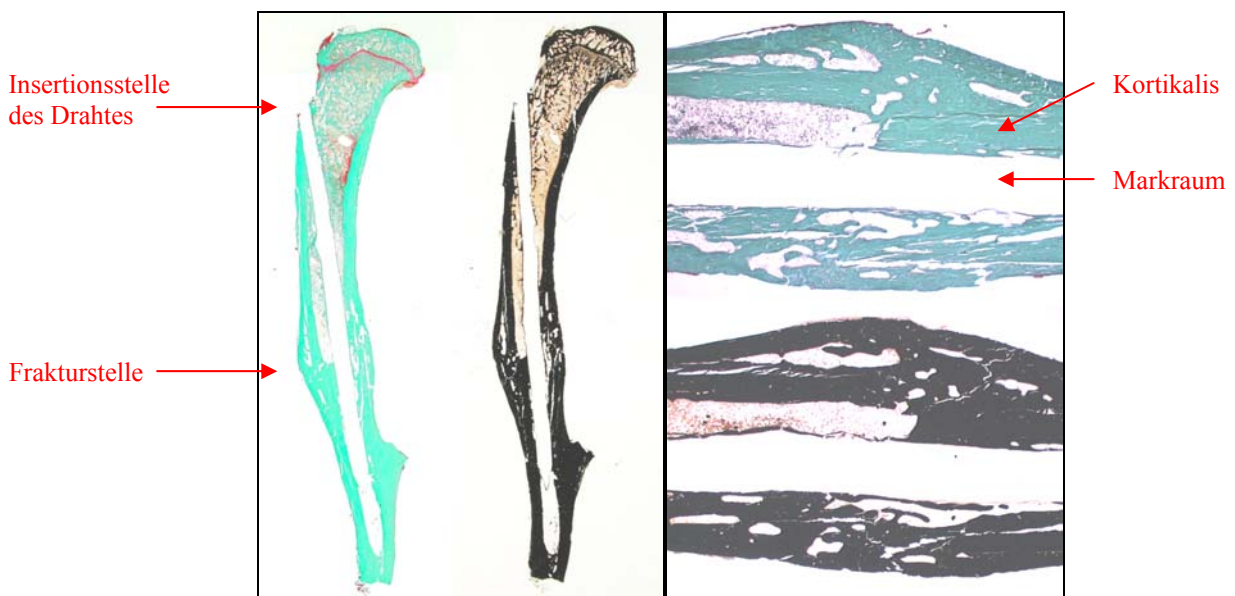


Abbildung 23: Linke Hälfte: Eine Tibia aus der Kontrollgruppe in Safranin O/Lichtgrün-Färbung (grün + rot) und in von Kossa-Färbung (schwarz + braun). Rechte Hälfte: Ausschnittsvergrößerung aus dem Kallusbereich derselben Tibia.

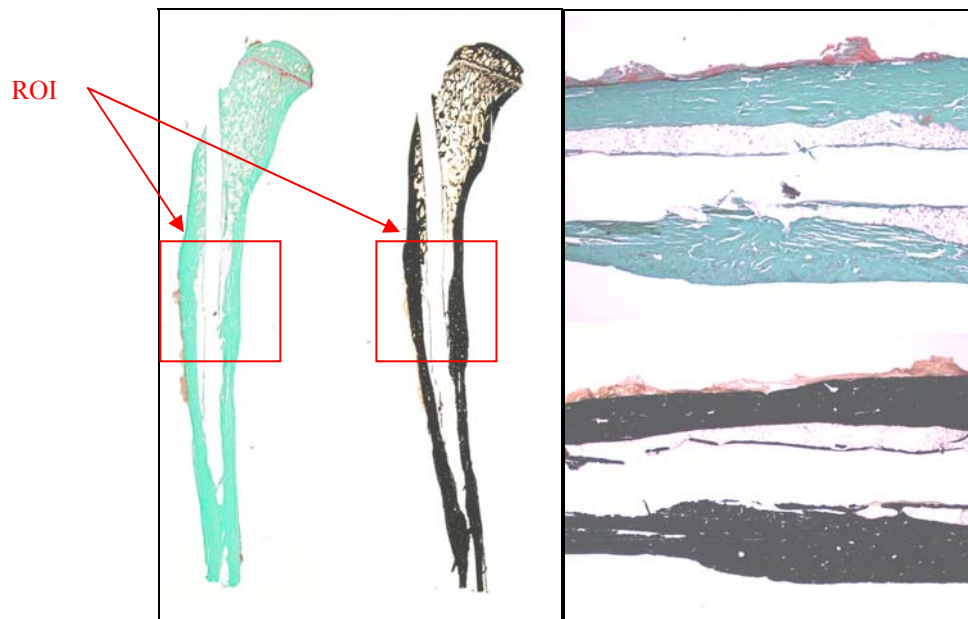


Abbildung 24: Linke Hälfte: Eine Tibia aus der PDLLA-Gruppe in Safranin O/Lichtgrün-Färbung (grün + rot) und in von Kossa-Färbung (schwarz + braun). Rechte Hälfte: Ausschnittsvergrößerung aus dem Kallusbereich derselben Tibia.

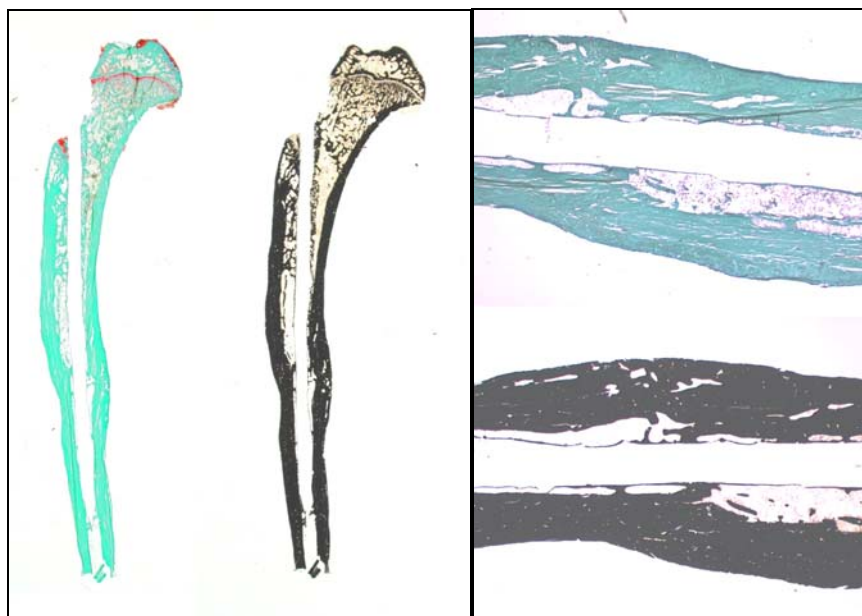


Abbildung 25: Linke Hälfte: Eine Tibia aus der WF-Gruppe in Safranin O/Lichtgrün-Färbung (grün + rot) und in von Kossa-Färbung (schwarz + braun). Rechte Hälfte: Ausschnittsvergrößerung aus dem Kallusbereich derselben Tibia.

Folgende Parameter wurden in der Region of Interest (ROI) zur Analyse ausgewertet:

- Tibiadurchmesser (Baseline)
- Kortikalis: Fläche, Knochen, Dichte (Knochen/Fläche)
- Periostaler Kallus: Fläche, Knochen, Dichte
- Endostaler Kallus: Fläche, Knochen, Dichte
- Knorpelfläche: gesamt, periostal, endostal

Für die gemessenen Werte siehe Tabelle 13 bis 17.

Tabelle 13: Baseline

	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF-β1
Tibiadurchmesser [mm]	2,75 ± 0,26	2,59 ± 0,14	2,71 ± 0,28

Tabelle 14: Kortikalis

	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF-β1
Kortikalisfläche [mm ²]	9,75 ± 2,38	9,49 ± 1,90	9,40 ± 1,47
Knöcherner Fläche [mm ²]	9,47 ± 2,32	9,27 ± 1,91	9,15 ± 1,48
Knöcherner Anteil Kortikalis [%]	97,18 ± 1,02	97,54 ± 1,05	97,35 ± 0,74

Tabelle 15: Gesamtkallus

	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF-β1
Gesamtfläche Kallus [mm ²]	14,80 ± 2,80	10,94 ± 2,90	14,54 ± 3,44
Knöcherne Fläche [mm ²]	10,34 ± 2,09	7,70 ± 2,48	10,42 ± 2,60
Knöcherner Anteil Gesamtkallus [%]	71,0 ± 10,80	70,7 ± 7,68	72,8 ± 6,53
Knorpelfläche Gesamtkallus [mm ²]	0	0	0
Knorpelanteil Gesamtkallus [%]	0	0	0

Tabelle 16: Endostaler Kallus

	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF-β1
Gesamtfläche endost. Kallus [mm ²]	4,60 ± 1,82	4,04 ± 0,62	4,61 ± 1,42
Knöcherne Fläche [mm ²]	1,16 ± 0,38	1,06 ± 0,43	1,14 ± 0,46
Knöcherner Anteil endost. Kallus [%]	28,9 ± 13,7	30,1 ± 12,8	23,3 ± 6,72
Knorpelfläche endost. Kallus [mm ²]	0	0	0
Knorpelanteil endost. Kallus [%]	0	0	0

Tabelle 17: Periostaler Kallus

	Kontrolle	PDLLA	IGF-I + TGF-β1
Gesamtfläche periost. Kallus [mm ²]	10,20 ± 2,84	6,90 ± 2,55	9,93 ± 2,73
Knöcherne Fläche [mm ²]	9,18 ± 2,09	6,65 ± 2,49	9,28 ± 2,34
Knöcherner Anteil periost. Kallus [%]	91,2 ± 5,91	96,2 ± 3,11	93,9 ± 5,06
Periost. Kallusfläche / Baseline [mm]	3,76 ± 1,16	2,67 ± 0,99	3,70 ± 1,06
Knorpelfläche periost. Kallus [mm ²]	0	0	0
Knorpelanteil periost. Kallus [%]	0	0	0

Der Tibiadurchmesser zeigte mit $2,75 \pm 0,26$ (Kontrolle), $2,59 \pm 0,14$ (PDLLA) und $2,71 \pm 0,28$ mm (WF) keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p > 0,05$ nach ANOVA). Er diente in allererster Linie als Bezugsgröße für die ROI (Region of interest).

Die Kortikalis wurde vom Marknagel oder durch die Beschichtung nicht in negativer Weise beeinflusst. Es konnten keine Verformungen, Osteolysen oder andere Veränderungen beobachtet werden. Die Kortikalis war dicht und hoch mineralisiert. Die Dichte betrug in der Kontrollgruppe $97,2 \pm 1,02$, in der PDLLA-Gruppe $97,5 \pm 1,05$ und in der WF-Gruppe $97,4 \pm 0,74$ % ($p > 0,05$ nach ANOVA).

Das Kallus-Remodeling war bei allen Untersuchungsgruppen weit fortgeschritten. Die Kortizes waren gut konsolidiert, die Kalli wiesen einen hohen Mineralisierungsgrad auf, der sich gut in der periostalen Kallusdichte mit $91,2 \pm 5,91$ (Kontrolle), $96,2 \pm 3,11$ (PDLLA) und $94,0 \pm 5,06$ % (WF) ausdrückte ($p > 0,05$ nach ANOVA). Auch die periostale Kallusfläche bezogen auf den Tibiadurchmesser war mit $3,76 \pm 1,16$ (Kontrolle), $2,67 \pm 0,99$ (PDLLA) und $3,70 \pm 1,06$ mm nicht signifikant verschieden zwischen den Gruppen ($p > 0,05$ nach ANOVA).

Die Lokalisation des Frakturspalts war noch zu erkennen. Knorpelnester konnten nicht nachgewiesen werden bzw. es konnten überhaupt keine Knorpelzellen in allen drei Untersuchungsgruppen in der ROI entdeckt werden. Insgesamt waren sich die Kallusbilder aller drei Gruppen sehr ähnlich.

3.6 Untersuchungen früherer Zeitpunkte

In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe wurden in einem identischen Versuchsaufbau die Zeitpunkte 28 und 42 Tage nach Fraktur der Rattentibia untersucht. Die Marknägel waren ebenfalls entweder unbeschichtet oder mit PDLLA beschichtet oder mit PDLLA und eingearbeiteten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 beschichtet. Die Tibiae wurden biomechanisch und histomorphologisch/-morphometrisch auf dieselbe Weise untersucht. Diese Arbeiten sind nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit.

Im Folgenden sollen die biomechanischen und die histomorphometrischen Ergebnisse 4 Wochen und 6 Wochen nach OP mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit (12 Wochen nach OP) verglichen werden. [Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D et al. 2004]

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für das maximale Drehmoment zu den drei genannten Zeitpunkten eingetragen.

Vier Wochen nach der Operation liegt das maximale Drehmoment der Kontrollgruppe signifikant unterhalb der PDLLA- und WF-Gruppe. Die WF-Gruppe zeigt das höchste Drehmoment zu diesem Zeitpunkt. Sechs Wochen nach der Fraktur steigt das maximale Drehmoment in allen Gruppen an. Das Ergebnis der Kontrollgruppe liegt aber weiterhin signifikant unterhalb der WF-Gruppe. Die Differenz zwischen allen Gruppen ist im Vergleich zu vier Wochen postoperativ geringer. Zwölf Wochen nach der Operation sind die Werte für das maximale Drehmoment nicht signifikant verschieden zueinander.

Maximales Drehmoment - Verlauf

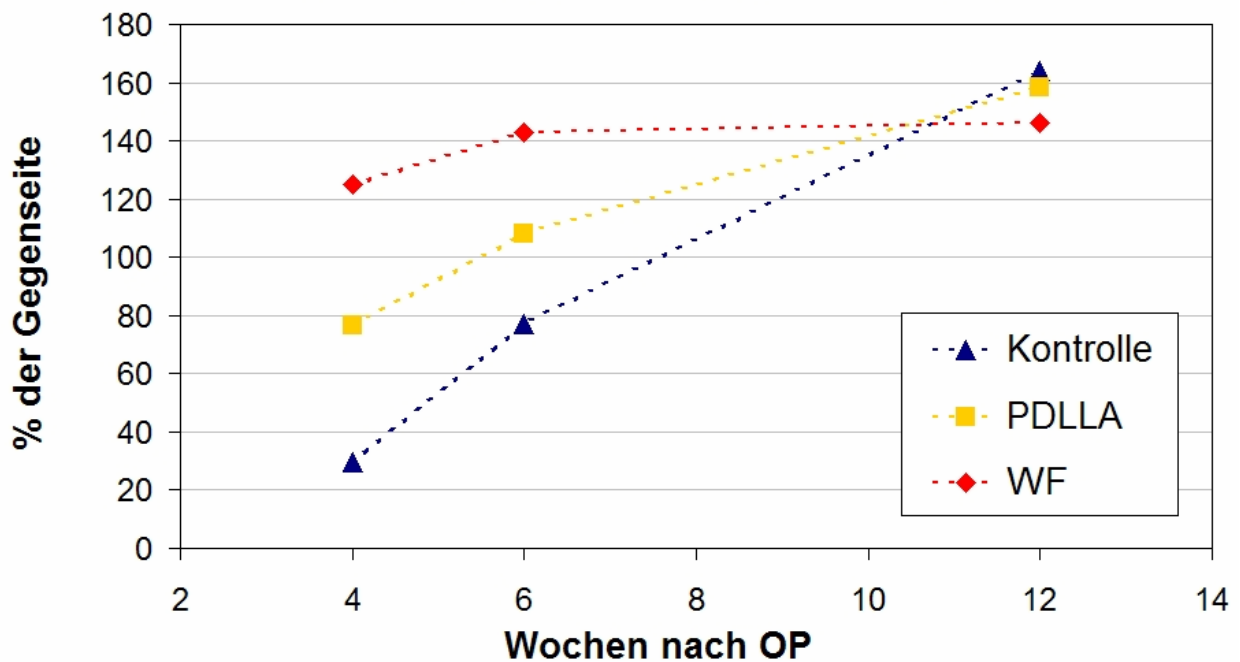


Abbildung 26: Vergleich des maximalen Drehmoments zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der torsionalen Steifigkeit zu den genannten Zeitpunkten aufgetragen.

Vier Wochen nach der Operation liegt die torsionale Steifigkeit der Kontrollgruppe signifikant unterhalb der PDLLA- und WF-Gruppe. Die WF-Gruppe zeigt die höchste torsionale Steifigkeit zu diesem Zeitpunkt. Sechs Wochen nach der Fraktur steigt die torsionale Steifigkeit in allen Gruppen an. Das Ergebnis der Kontrollgruppe liegt aber weiterhin signifikant unterhalb der WF-Gruppe. Zwölf Wochen nach der Operation sind die Werte für die torsionale Steifigkeit nicht signifikant verschieden zueinander.

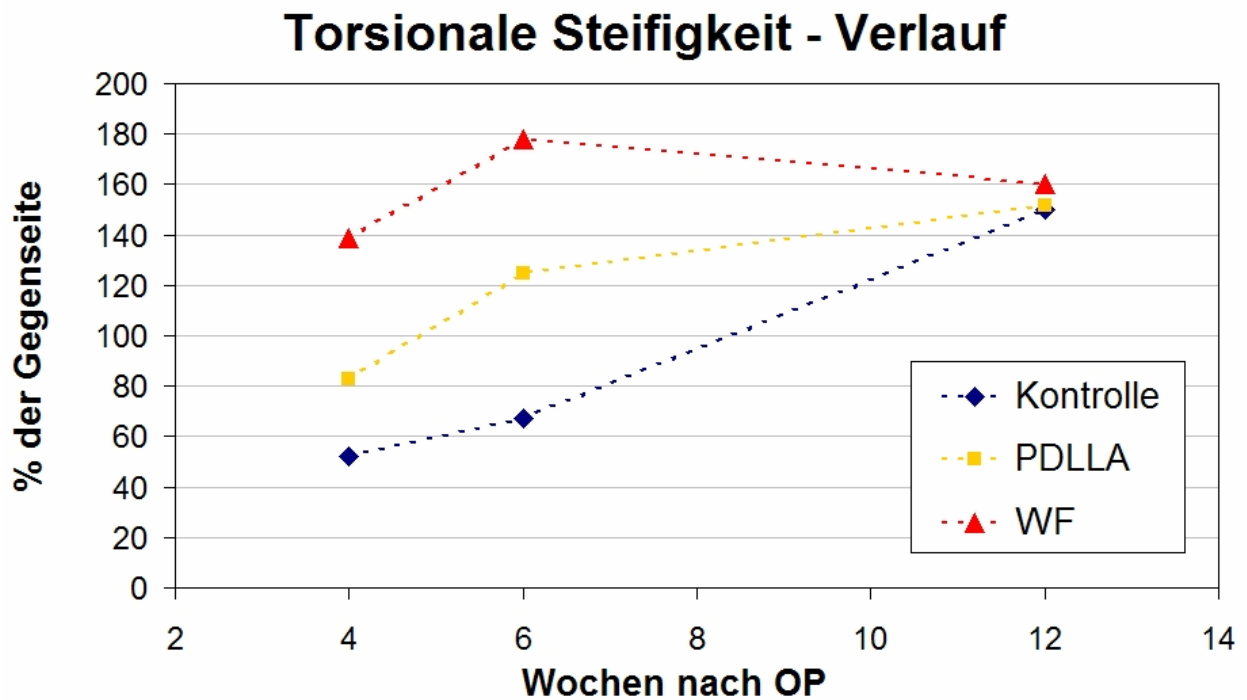


Abbildung 27: Vergleich der torsionalen Steifigkeit zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP

Am deutlichsten werden die Verlaufsunterschiede bei der untersuchten Knorpelfläche pro Kallusfläche. Zum Untersuchungszeitpunkt 4 Wochen hat die WF-Gruppe signifikant weniger Knorpelfläche im Kallus als die anderen beiden Gruppen ($p < 0,05$ nach ANOVA). Dieser Unterschied wird zum Zeitpunkt 6 Wochen größer. Sowohl die PDLLA- als auch die WF-Gruppe haben signifikant weniger Knorpelfläche als die Kontrollgruppe. 12 Wochen nach der OP konnten allerdings in allen Gruppen bei keiner Tibia Knorpelzellen nachgewiesen werden (Siehe Abbildung 28).

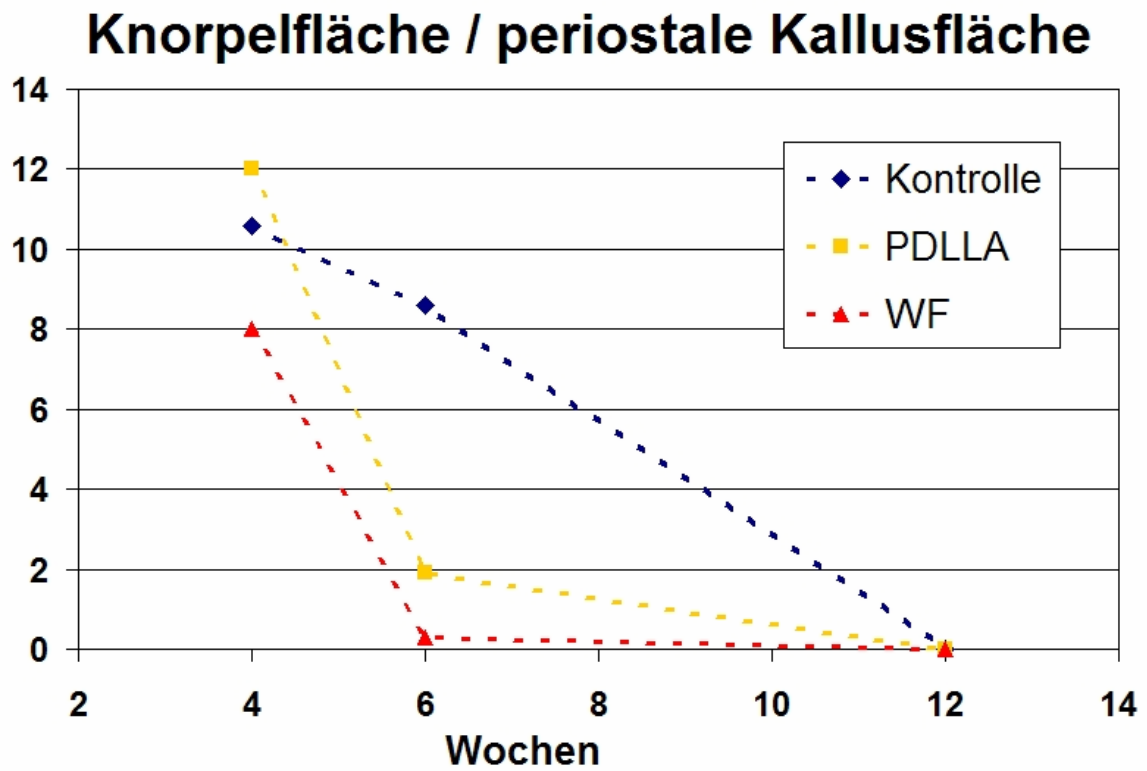


Abbildung 28: Vergleich der Knorpelfläche pro periostaler Kallusfläche in Prozent zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frakturheilung im Rattenmodell mit speziellem Augenmerk auf die Phase des Remodelings und den Einfluss der lokal applizierten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1.

Die Untersuchung der späten Phase der Frakturheilung unter lokal applizierten Wachstumsfaktoren soll Aufschluss über den Einfluss der Faktoren auf das Remodeling geben. Mögliche Bedenken beim Einsatz von WF könnten sein, dass Komplikationen auftreten, die eine klinische Anwendung limitieren. Denkbar wären mechanische Komplikationen mit überschüssendem Kallus und einer daraus resultierenden relativen Schwächung des Knochens unter- und oberhalb der Frakturstelle. Refrakturen im oder am Kallus wären möglich. Pathophysiologische Veränderungen durch die langandauernde Stimulation mit Störung der physiologischen Heilungsprozesse und eventuell auftretenden reaktiven Prozessen wie Osteolysen nach Abfall der stimulierenden Wirkung der Wachstumsfaktoren wären ebenfalls vorstellbar. Um diese Fragestellungen zu beleuchten, wurde die durch Wachstumsfaktoren beeinflusste Frakturheilung mit der unbeeinflussten verglichen.

Es wurden 3 Versuchsgruppen untersucht. Nach Fraktur wurde die Tibia mit einem unbeschichteten oder einem PDLLA-beschichteten oder einem PDLLA- und WF-beschichteten Titankirschnerdraht stabilisiert. 12 Wochen nach der Fraktur wurden die Tibiae radiologisch ausgewertet, biomechanisch auf Torsion getestet und histomorphometrisch untersucht. Bei allen Messungen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen festzustellen. Alle Frakturen waren in den radiologischen Bildern konsolidiert mit knöcherner Überbrückung aller vier Kortizes. Die torsionale Stabilität war sowohl beim maximalen Drehmoment als auch bei der torsionalen Steifigkeit durchgehend höher (durchschnittlich circa 50 Prozent) als die nicht frakturierte Gegenseite jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Der Kallus war makroskopisch immer noch sichtbar. Histologisch zeigte sich, dass er aus mineralisiertem Gewebe ohne jegliche Knorpelzellen bestand. Die Berechnung der knöchernen und knorpeligen Fläche und die Knochendichte ergaben auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Vorherige Studien von Schmidmaier et al. haben die Frakturheilung unter Stimulation mit den Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 zu den Zeitpunkten 4 und 6 Wochen am identischen

Rattenmodell untersucht [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2000]. In der vorangegangenen Studie wurden gleiche Gruppen, eine Kontroll-, eine PDLLA- und eine WF-Gruppe, mit vergleichbaren Methoden, Biomechanik, Histologie und Radiologie, untersucht. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden für die aktuelle Arbeit die gleichen Arbeits-, Untersuchungs- und Auswertungsmethoden verwendet. Der Unterschied liegt im Untersuchungszeitpunkt, der bei dieser Arbeit bei 12 Wochen nach der OP liegt.

Es wurden bei der vorangehenden Studie stimulierende Effekte der bioaktiven Beschichtung von Implantaten auf die Frakturheilung demonstriert. Die Ergebnisse der biomechanischen Testungen, der histomorphometrischen Analyse und der radiologischen Auswertungen zeigten 6 Wochen nach Fraktur eine signifikante Beschleunigung der Frakturheilung in der WF-Gruppe. Die Tibiae zeigten im Vergleich zur Kontroll- und PDLLA-Gruppe biomechanisch eine signifikant erhöhte torsionale Stabilität. Histomorphometrisch war das Remodeling weiter fortgeschritten. Nur 0,3 % der periostalen Kallusfläche bestand aus Knorpel. In der Kontrollgruppe bestand nach 6 Wochen 8,6 % der periostalen Kallusfläche aus Knorpel. Die radiologische Analyse bekräftigt diese Aussagen. Die knöcherne Überbrückung des Frakturspalts ist bei den mit WF-behandelten Tibiae häufiger und schneller vollständig als bei den anderen Gruppen. Aber auch die PDLLA-Gruppe ohne eingearbeitete Wachstumsfaktoren zeigte eine beschleunigte Frakturheilung mit signifikant erhöhter torsionaler Stabilität und weiter fortgeschrittenem Remodeling sowohl histomorphometrisch als auch radiologisch.

Diese Arbeit demonstriert klar zusammen mit den Ergebnissen von Schmidmaier et al., dass die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- β 1 zu den frühen Zeitpunkten, 4 und 6 Wochen nach Fraktur, die Frakturheilung deutlich beschleunigen. Nach 12 Wochen präsentiert sich allerdings eine Kallusmorphologie, welche vergleichbar ist mit der der Kontrollgruppe. Dieses Kallusbild repräsentiert eine späte Phase des Remodelings. Die Knorpelfläche aus den früheren Heilungsphasen hat sich vollständig in mineralisiertes Knochengewebe umgewandelt. Insuffizientes Knochengewebe konnte nicht nachgewiesen werden. Der physiologische Heilungsprozess wurde also nicht verändert.

Weitere Hinweise, dass die physiologischen Prozesse durch die beschriebene lokale Applikation von Wachstumsfaktoren nicht verändert werden, lassen sich aus der Studie von Wildemann et al. ableiten. In dieser Studie wurde an einem vergleichbaren Rattenmodell die frakturierte Tibia mit einem unbeschichteten Kirschnerdraht als auch mit einem IGF-I und TGF- β 1 – beschichteten Draht stabilisiert. Es wurde die Proteinkonzentration von IGF-I und TGF- β 1 zu verschiedenen

Zeitpunkten nach der Fraktur im Kallus quantifiziert. Zusätzlich wurde die Verteilung der Proteine und der dazugehörigen mRNA-Expression mit Hilfe der Immunohistochemie und der in situ-Hybridisation untersucht. Die Proteinkonzentration von IGF-I und TGF- β 1 zeigte im Vergleich zur unfrakturierten Seite deutliche Veränderungen. So stieg die Konzentration von IGF-I im Kallus signifikant an und die Konzentration von TGF- β 1 war von Anfang an deutlich erhöht. Allerdings zeigten sich zwischen der beeinflussten und der unbeeinflussten Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Histomorphologisch fanden sich in der Gruppe der beeinflussten Frakturheilung Zeichen der fortgeschrittenen Kallusheilung. Sowohl IGF-I als auch TGF- β 1 wurden in Osteoblasten, Osteoklasten, Chondrozyten und mesenchymalen Zellen nachgewiesen. Aber weder die Immunohistochemie noch die in situ-Hybridisation ließen Unterschiede in der Expression von IGF-I und TGF- β 1 und dem Protein zwischen den Gruppen erkennen. Diese Ergebnisse können als starkes Indiz gewertet werden, dass die mit IGF-I und TGF- β 1 beeinflusste Frakturheilung den physiologischen Heilungsprozess nicht verändert sondern lediglich beschleunigt. [Wildemann B, Schmidmaier G et al. 2004]

Versuche wurden auch an einem großen Tiermodell mit Yucatan-Minischweinen durchgeführt [Raschke M et al. 2002]. Die kombinierte Gabe von IGF-I und TGF- β 1 über einen PDLLA-beschichteten Marknagel konnte die Osteotomieheilung beschleunigen ohne Hinweise für pathophysiologische Prozesse. Die biomechanischen und histologischen Ergebnisse stehen im Einklang mit denen des Rattenmodells.

Verschiedene Studien zeigten, dass man ektop in verschiedenen Gewebearten die Knochenbildung mit dem Wachstumsfaktor BMP induzieren konnte [Wang EA et al. 1990], [Okubo Y et al. 2000].

Implantierte Titanplatten in Schafsmuskeln, die unbeschichtet, mit PDLLA beschichtet, mit PDLLA und eingebundenen IGF-I und TGF- β 1 und mit PDLLA und BMP-2 beschichtet waren, zeigten in keiner Gruppe eine ektope Knochenbildung. Aber die BMP-2-Gruppe zeigte eine signifikant größere fibröse Kapselfläche als die Kontroll- und die PDLLA-Gruppe. Aber auch die IGF-I und TGF- β 1-Gruppe zeigte eine signifikant höhere Kapselfläche als zumindest die Kontrollgruppe [Wildemann B, Kandziora F et al. 2004]. Bei ausgeschlossener ektoper Knochenbildung zeigte die Kombination von in PDLLA eingearbeitetem IGF-I und TGF- β 1 zumindest eine geringere Umgebungsreaktion als bei BMP. Zusätzlich wurde keine Veränderung festgestellt, die auf einen relevanten, pathophysiologischen Prozess hindeutete.

Zahlreiche Applikationsmethoden für bioaktive Substanzen werden in der Literatur beschrieben. Die Ergebnisse mancher Versuchsreihen mit ein und demselben Wachstumsfaktor wurden dabei maßgeblich von der Applikationsmethode bestimmt. Der Effekt der Wachstumsfaktoren wurde somit nicht nur von der Auswahl und Konzentration sondern auch zu einem erheblichen Teil von der Methode der Verabreichung bestimmt. Letztlich wurden in manchen Studien allein durch die Applikation Komplikationen verursacht, die weiter unten erläutert werden. [Zellin G et al. 1997]

Die Applikationsmethoden lassen sich in lokale und systemische Methoden unterteilen, die im Folgenden diskutiert werden.

Systemisch wurden Wachstumsfaktoren über subkutane Injektionen [Raschke M et al. 2001], intravenöse Injektionen [Nakamura T et al. 1995], intraarterielle Katheter [Nilsson A et al. 1987] und osmotische Pumpen [Thaller SR, Hoyt J et al. 1993] verabreicht.

Die Applikation von IGF-I mittels lokaler arterieller Infusionen über osmotische Minipumpen zeigte keine signifikant messbare Antwort bezüglich des Knochenwachstums bei hypophysectomierten Ratten [Nilsson A et al. 1987]. Auch subkutan platzierte osmotische Pumpen zur Verabreichung von IGF-I ergaben keine signifikanten Ergebnisse in der Knochenheilung [Thaller SR, Hoyt J et al. 1993]. Beide Applikationsmethoden sind aufwändig, unpraktikabel und konnten sich in der Therapie der Frakturheilung deshalb in späteren Studien nicht durchsetzen.

Tägliche subkutane Injektionen von GH beim Yucatan-Minischwein zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stimulierte Frakturheilung mit erhöhter biomechanischer Stabilität. Des Weiteren war der Serumspiegel von IGF-I signifikant erhöht. Dies lässt vermuten, dass die Stimulation der Frakturheilung systemisch getriggert wurde mit lokaler Wirkung im Frakturbereich über den endokrinen Weg der GH-IGF-I-Achse [Raschke M et al. 2001]. Allerdings gibt es auch frustrane Versuche, mit subkutanen Injektionen von GH einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilung zu erreichen [Carpenter J et al. 1992].

Intravenöse Injektionen von basic Fibroblast growth factor (bFGF) in Ratten stimulierten die endostale Knochenbildung. Interessanterweise zeigten immunohistochemische Untersuchungen mit Antikörper gegen TGF- β 1 einen deutlichen Anstieg von TGF- β 1 in Osteoblasten und in der Knochenmatrix, so dass vermutet werden kann, dass ein Teil der Wirkung durch TGF- β 1 selber verursacht worden ist [Nakamura T et al. 1995].

Es könnte sein, dass die systemische Applikation von Wachstumsfaktoren indirekt über IGF-I und TGF- β 1 einen lokalen Einfluß auf den Knochenstoffwechsel bzw. auf die Frakturheilung hat. Sinnvoller erscheint dann die direktere Beeinflussung der Frakturheilung über eine lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1. Somit könnten unerwünschte Wirkungen von systemisch verabreichten Wachstumsfaktoren reduziert oder sogar vermieden werden. Beschriebene Nebenwirkungen von systemisch verabreichten WF reichen von Gewichtsveränderungen [Bak B et al. 1990], Hypoglykämien und Elektrolytveränderungen [Wilton P et al. 1992], Blutbildveränderungen bis hin zu Leber- und anderen Organläsionen bei Toxizitätsversuchen [Terrell TG et al. 1993].

Lokal wurden Wachstumsfaktoren in Form von direkten Injektionen [Inui K et al. 1998], über Minipellets [Inui K et al. 1998], abbaubare Partikel aus Poly(Laktid-co-Glycolid) [Bax BE et al. 1999], Kollagengel [Bax BE et al. 1999], Kollagenschwämme [Welch RD et al. 1998], lokal platzierten osmotischen Minipumpen [Lind M et al. 1993], Adenoviren in der Funktion von Vektoren [Baltzer AW et al. 2000] und über die bereits beschriebene PDLA-Beschichtung appliziert.

Die Methoden allein mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen haben ungeachtet der Wachstumsfaktoren deutlich unterschiedliche Ergebnisse erbracht.

Osmotische Minipumpen am Osteotomiespalt mit Applikation von TGF- β 1 zeigten nur teilweise positive Effekte auf die Knochenheilung. Zudem ist die Platzierung aufwändig, kompliziert und muss offen erfolgen, so dass sich diese Methode nicht durchsetzen konnte [Lind M et al. 1993].

Adenoviren als Vektoren für das BMP-2-Gen haben bei Kaninchen mit segmentalen Femurdefekten zu einer hochsignifikanten Heilung geführt. Die Kontrollgruppe war selbst nach 12 Wochen radiologisch nicht stabil verheilt [Baltzer AW et al. 2000]. Es bleibt abzuwarten, ob und wann diese Technik für eine klinische Anwendung ausgereift sein wird, zumal in der Vergangenheit bei Gentherapien am Menschen mehrere Todesfälle aufgetreten sind [Förstermann U 2003]. Dieses Risiko ist natürlich in der Frakturheilung völlig inakzeptabel. Denkbar und wesentlich sicherer wäre hier ein non-viraler Gentransfer, der von der Arbeitsgruppe entwickelt und auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse derzeit untersucht wird.

Die Injektion von Wachstumsfaktoren birgt auch bei Einhaltung steriler Bedingungen die Gefahr der Keimverschleppung in den Frakturspalt mit daraus resultierenden Komplikationen. Zudem

muss die Nadel gut im Frakturspalt platziert sein, damit der Wachstumsfaktor am Ort des Geschehens wirken kann. Der Material- und Arbeitsaufwand ist dafür überschaubar. Nur zeigte sich im Tierexperiment keine signifikante Beschleunigung. Bei Kaninchen mit segmentalem Knochendefekt hatte der Fibroblast growth factor (FGF), der injiziert worden ist, keine Wirkung auf die Heilung. Wurde aber FGF in Form von Minipellets verabreicht, so kam es zu einer Überbrückung des Spalts mit Knochen- und Knorpelgewebe [Inui K et al. 1998].

Es wurden auch verschiedene andere Trägermaterialien für Wachstumsfaktoren in den Frakturspalt eingebracht. Nachteilig ist dabei, dass der Frakturspalt teilweise oder sogar ganz eröffnet werden muss. Es wird ein zusätzlicher Weichteilschaden zum bereits frakturbedingt vorhandenen gesetzt.

Die Applikation von Wachstumsfaktoren über abbaubare Partikel aus Poly(Laktid-co-Glycolid) und Kollagengel verzögerte die Knochenheilung im Vergleich zur Kontrollgruppe, da beide Trägerformen als physikalische Barriere wirkten. Außerdem wurde eine Fremdkörperreaktion mit eingewanderten Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen beobachtet [Bax BE et al. 1999].

Auch Kollagenschwämme, die um die Fraktur gewickelt oder gefaltet in den Frakturspalt gelegt worden sind, wurden mit unterschiedlichen Ergebnissen eingesetzt. Die Applikation erforderte eine operative Eröffnung der Fraktur mit entsprechendem Operationsrisiko bei fraglichem Nutzen [Welch RD et al. 1998]. Zudem setzen Kollagenschwämme Substanzen relativ schnell und nicht kontinuierlich frei [Sorensen TS et al. 1990] und bestehen teilweise aus bovinem Material, was zu allergischen Reaktionen führen kann [Takaoka K et al. 1991].

Diese negativen Aspekte konnten bei der Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung nicht beobachtet werden.

Es wurden bei der Applikationsart über die PDLLA-Beschichtung systemisch keine Veränderungen registriert, die spezifisch für eine der drei Untersuchungsgruppen (Kontrollgruppe, PDLLA, WF) wären. Das Blutbild, die Elektrolyt- und Glukose-Werte, Gewicht und Temperatur waren unauffällig. Auch die Serumspiegel von IGF-I und den IGF bindenden Proteinen 1 bis 4 (IGFBP 1-4) zeigten keine Veränderungen [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001].

Die in die PDLLA-Beschichtung eingearbeitete Menge von 50 µg (5 % w/w) IGF-I und 10 µg (1 % w/w) TGF-β1 erscheint im Verhältnis zum gesamten Organismus gering, aber aufgrund der lokalen Applikation kann am und im Frakturspalt eine hohe Wirkkonzentration erreicht werden,

ohne dass es zu Nebenwirkungen kommt, wie sie bei systemischer Gabe beobachtet worden sind [Wilton P et al. 1992].

Innerhalb der ersten 48 Stunden werden ungefähr 50 % jeweils beider WF aus der PDLLA-Beschichtung freigesetzt. Nach 6 Wochen erhöht sich der Wert auf ungefähr 70 %. Dem initialen Anstieg folgt eine relativ gleichmäßige und kontinuierliche Abgabe [Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A et al. 2001]. Diese Freisetzungskinetik scheint günstig zu sein, da die Frakturheilung überwiegend in der Anfangsphase (3 Wochen) durch WF beeinflussbar ist [Bak B et al. 1991].

In der Gruppe mit PDLLA-Beschichtung zeigte sich mikroskopisch weder ein Reabsorptionssaum noch eine verstärkte Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion. Diese Aussagen werden noch von der Studie unterstützt, in der die Biokompatibilität dieser Beschichtung untersucht wurde. Bezüglich der Dichte von Monozyten und Makrophagen wurden keine Unterschiede zur unbeschichteten Kontrollgruppe festgestellt zu den Zeitpunkten 5, 10 und 15 Tage. Zum Zeitpunkt 28 Tage waren sogar signifikant weniger Monozyten und Makrophagen vorhanden als in der Kontrollgruppe [Wildemann B, Sander A et al. 2005]. Trotzdem konnte man interessanterweise zu den Zeitpunkten 4 und 6 Wochen bei der PDLLA-Beschichtung ohne eingebundene WF eine positive Wirkung auf die Frakturheilung beobachten [Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. 2001].

Es wird vermutet, dass der Abbau des Polymers zu Laktat zu einer Ansäuerung des umgebenden Milieus führt. Diese wiederum führt zu einer Inflammation und Ausschüttung von Cytokinen, welche in gewissen Maßen einen positiven Effekt auf die Frakturheilung haben. Des Weiteren führt der erniedrigte pH-Wert zu einer erhöhten Freisetzung von an Bindungsproteine gebundenen Wachstumsfaktoren. [Laurencin C et al. 1994][Peltoniemi HH et al. 1999]

Anhand der Langzeitergebnisse der vorliegenden Studie und den früheren Studien der Arbeitsgruppe lässt sich schlussfolgern, dass diese Technik der Verabreichung von WF für die klinische Behandlung von Frakturen sehr geeignet zu sein scheint. Zunächst einmal dient das langbewährte Implantat der Stabilisierung der Fraktur. Zusätzlich könnte man über die Beschichtung Medikamente bzw. bioaktive Substanzen zur Verbesserung der Frakturheilung verabreichen. Man bräuchte keine weiteren Geräte zur Applikation von Medikamenten. Keine für den Patienten unbequemen Injektionen wären notwendig, keine systemische Gabe mit der Gefahr von Nebenwirkungen. Außerdem muss man die Fraktur nicht eröffnen, um lokal bioaktive Substanzen zu platzieren.

In die PDLLA-Beschichtung wurden ferner Antibiotika eingearbeitet und mit Erfolg am Rattenosteomyelitis-Modell getestet [Lucke M et al. 2003, Nr. 1][Lucke M et al. 2003, Nr. 2]. Die Erfolg versprechenden Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen führten dazu, dass erste humane Anwendungen durchgeführt werden konnten. Mit Gentamicin beschichtete Tibiamarknägel wurden schon bei 8 Patienten mit komplizierten Unterschenkelbrüchen implantiert. Unerwünschte Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt [Raschke MJ, Schmidmaier G 2004], [Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B et al. 2006].

In der Zukunft wird man sicherlich noch viele Fragen klären müssen und wollen. WF haben in manchen Studien alleine und in Kombination deutliche Wirkung gezeigt. Welche Prozesse und Kaskaden genau in Gang gesetzt werden, ist noch unklar. Die Komplexität wird noch durch die Anzahl der WF, die verschiedenen Funktionen und die Wechselwirkungen untereinander erhöht. Die PDLLA-Beschichtung könnte sich bei der Applikationsart als Schlüsseltechnologie herausstellen. Sie ist biokompatibel, unkompliziert und flexibel, verhält sich jedoch nicht neutral. Die Gründe für einen positiven Einfluß auf die Frakturheilung sind nicht geklärt. Auch hier bieten sich viele neue Forschungsansätze.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Untersuchungen der lokalen Applikation von IGF-I und TGF- β 1 zu verschiedenen Zeitpunkten eine beschleunigte Frakturheilung in der frühen Phase ergaben. Die torsionale Steifigkeit und das maximale Drehmoment waren erhöht, es war deutlich weniger Knorpel zu finden und der Frakturspalt war in den radiologischen Analysen häufiger knöchern überbrückt. In der späten Phase, in der das Remodeling stattfand, konnten keine signifikanten Unterschiede in der biomechanischen Stabilität und im Aufbau des Kallus festgestellt werden. Die radiologische Auswertung zeigte eine komplette Konsolidierung aller Frakturen. Allerdings war das Remodeling noch nicht abgeschlossen. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren die Frakturheilung in der frühen Phase beschleunigt und die Heilung im Verlauf in ein normales Remodeling mündet, ohne physiologische Prozesse zu verändern.

5 Zusammenfassung

Die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren beschleunigt die Frakturheilung in der Frühphase, wie in verschiedenen Studien demonstriert wurde. Dabei hat sich gezeigt, dass Insulin like growth factor I und Transforming growth factor β 1 (IGF-I und TGF- β 1) eine wichtige Rolle im heilenden Knochengewebe spielen. Die bisherigen Arbeiten zur Frakturheilung konzentrierten sich dabei auf die Beschreibungen der frühen Auswirkungen. Ziele dieser Arbeit waren die Untersuchung im langfristigen Verlauf der unstimulierten, physiologischen Frakturheilung und die Untersuchung der mit lokal applizierten IGF-I und TGF- β 1 stimulierten Frakturheilung an der Tibia im Rattenmodell. Über Vergleiche mit vorherigen Arbeiten können Aussagen über die physiologische Frakturheilung im langfristigen Verlauf getroffen werden, z.B. ob die Stimulation mit Wachstumsfaktoren einen langfristigen Effekt hat und ob die angewendete Applikationsmethode mit der Beschichtung langfristige Folgen hat.

Mit Hilfe einer Frakturmaschine wurde Ratten standardisiert eine geschlossene Fraktur der Tibia und Fibula gesetzt. Anschließend wurde die Tibia intramedullär mit einem Kirschner-Draht stabilisiert. Der Draht diente neben der Stabilisierung in der Effektgruppe auch der lokalen Wirkstofffreisetzung und war mit Poly(D,L-Laktid) und eingearbeiteten IGF-I und TGF- β 1 beschichtet. In einer weiteren Gruppe wurde nur Poly(D,L-Laktid) ohne Wachstumsfaktoren verwendet. Als Kontrollen wurden unbeschichtete Titandrähte verwendet.

Röntgenbilder des Hinterlaufs wurden postoperativ und im Heilungsverlauf durchgeführt. Nach 12 Wochen erfolgte die Tötung der Ratten. Nach Freipräparation der Tibiae wurden die Knochen biomechanisch auf torsionale Stabilität und histomorphometrisch untersucht (von Kossa- und Safranin O/Lichtgrün-Färbung).

Nach 12 Wochen wiesen alle Gruppen eine radiologisch vollständige Konsolidierung des Frakturspaltes mit knöcherner Durchbauung und noch sichtbarem Kallus auf. Die torsionale Stabilität war im Vergleich zur gesunden nicht frakturierten Gegenseite erhöht aber ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die histomorphometrischen Untersuchungen stützten die Ergebnisse. In allen drei Gruppen zeigte sich ein ähnliches Kallusbild ohne signifikante Unterschiede. Die Kortikalis war dicht und hoch mineralisiert. Die periostale Kallusfläche und -dichte waren nicht signifikant verschieden. Im Frakturbereich wurde kein Knorpel in allen Kalli nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drei Versuchsgruppen sowohl radiologisch, histomorphometrisch als auch in der Stabilität eine vergleichbare Heilung zeigten. Trotz Konsolidierung und knöcherner Durchbauung ist sowohl die physiologische als auch die

stimulierte Frakturheilung noch nicht abgeschlossen und noch in der Phase des Remodelings. Die kombinierte Applikation von IGF-I und TGF- β 1 beschleunigt somit initial die Heilung, ohne dauerhaft den physiologischen Weg zu verändern.

Die Entwicklung zur Anwendung am Menschen erscheint nach heutigem Wissensstand möglich und sollte mit weiteren Arbeiten verfolgt werden.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008 Feb;87(2):107-18. Review.

Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res* 10: 1057-67, 1995.

Bak B, Jorgensen P, Andreassen T. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 61: 54-7, 1990.

Bak B, Jorgensen P, Andreassen T. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orth Rel Res* 264: 295-301, 1991.

Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Therapy* 7: 734-9, 2000.

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14: 1805-15, 1999.

Bax BE, Wozney JM, Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 65: 83-9, 1999.

Beck L, Amento E, Xu Y, Deguzman L, Lee W, Nguyen T, Gillet N. TGF-beta1 induces bone closure of skull defects - Temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta1. *J Bone Miner Res* 8: 753-61, 1993.

Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp Gerontol* 37: 553-65, 2002.

Bucholz RW, Henry S, Henley MB. Fixation with bioabsorbable screws for the treatment of fractures of the ankle. *J Bone Joint Surg Am* 76: 319-24, 1994.

Carpenter J, Hipp J, Gerhart T, Rudmann C, Hayes W, Trippel S. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg* 74A: 359-67, 1992.

Coles CP, Gross M. Closed tibial shaft fractures: management and treatment complications. A review of the prospective literature. *Can J Surg.* 2000 Aug;43(4):256-62. Review.

Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333: F105-F150, 1997.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* S7-21, 1998.

Eriksen E, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insuline like growth factors and bone remodelling. *Europ J Clin Invest* 26: 525-34, 1996.

Förstermann U. Gentherapie: Erste Erfolge – viele noch unerfüllte Hoffnungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100: A314-318 [Heft 6]

Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration: Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 277(33): -82, 2002.

Hutmacher D, Hurzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11: 667-78, 1996.

Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, Yamano Y, Kato Y, Koike T. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int* 63: 490-5, 1998.

Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson J, Isaksson O. Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 250: 367-72, 1986.

Joyce M, Roberts AB, Sporn M, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110: 2195-207, 1990.

Kandziora F, Schmidmaier G, Schollmeier G, Bail H, Pflugmacher R, Gorke T, Wagner M, Raschke M, Mittlmeier T, Haas NP. IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine. *Spine* 27: 1710-23, 2002.

Kassem M, Mosekilde L, Eriksen E. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. *Growth Regul* 4: 131-5, 1994.

Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F. Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res* 5: 169-81, 1971.

Lamberg A, Schmidmaier G, Søballe K, Elmengaard B. Locally delivered TGF-beta1 and IGF-1 enhance the fixation of titanium implants: a study in dogs. *Acta Orthop*. 2006 Oct;77(5):799-805.

Laurencin C, Lane JM. Poly/(lactic acid) and Poly(glycolic acid):Orthopaedic Surgery Applications. In: Brighton C, Friedlaender G, Lane JM, eds. *Bone Formation and Repair*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, p. 325-339, 1994.

Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 16: 144-50, 1998.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone- Biology and Clinical Applications. *Journal of Bone and Joint Surgery* 84-A: 1032-44, 2002.

Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 283: 2-37, 1998.

Lind M, Schumacker B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibia. *Acta Orthop Scand* 64: 553-6, 1993.

Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19: 1S-12S, 1996.

Lohmann R, Haid K, Stöckle U, Raschke M. Epidemiology and perspectives in traumatology of the elderly. *Unfallchirurg*. 2007 Jun;110(6):553-60; quiz 561-2. German.

Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas N, Raschke. Gentamicin Coating of Metallic Implants Reduces Implant Related Osteomyelitis in Rats. *Bone* 32: 521-31, 2003. Nr. 1

Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Stemberger A, Haas N, Raschke M. A new model of implant related osteomyelitis in rats. *J Biomed.Mater.Res*. 2003. Nr. 2

McCarthy T, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 124: 301-9, 1989.

Mundy GR. Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regul* 3: 124-8, 1993.

Nakamura K, Kurokawa T, Okazaki H, Mamada K, Hanada K, Hiyama Y, Aoyama I, Nakamura T, Tamura M. Local application of basic fibroblast growth factor into the bone increases bone mass at the applied site in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 115: 344-6, 1996.

- Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibunishi T, Nigi H, Fukumoto S, Matsumoto T. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* 136: 1276-84, 1995.
- Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res* 13: 942-9, 1998.
- Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Peterson L, Isaksson O. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calif Tissue Int* 40: 91-6, 1987.
- Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29: 62-6, 2000.
- Peltoniemi HH, Hallikainen D, Toivonen T, Helevirta P, Waris T. SR-PLLA and SR-PGA miniscrews: biodegradation and tissue reactions in the calvarium and dura mater. *J Craniomaxillofac Surg* 27: 42-50, 1999.
- Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald R, Minne H, Ziegler R. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between Insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology* 127: 69-75, 1990.
- Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, Dahne M, Roenne I, Haas N. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone* 29: 368-73, 2001.
- Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G. Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone* 30: 144-51, 2002.
- Raschke MJ, Schmidmaier G. Biologisierung von Implantaten in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates. *Der Unfallchirurg* 107: 653-63, 2004.
- Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop* 355: S294-S300, 1998.
- Saadah PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277: C628-C637, 1999.

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 May;37 Suppl 2:S105-12. Review.

Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants*. 2006;16(1):61-9. Review.

Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg A, Raschke M. Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing. *Chirurg* 71: 1016-22, 2000.

Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Fuchs T, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28: 341-50, 2001.

Schmidmaier G, Wildemann B, Lucke M, Stange R, Gäbelein T, Heeger J, Bail H, Raschke M. Insulin like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) have synergistic effects on fracture healing in rats. *Trans 47 Meeting of Orthop Res Soc* 26: 102, 2001.

Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res, Applied Biomat* 58: 449-55, 2001.

Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M. BMP-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment. *Bone* 6: 618-22, 2002.

Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T, Heeger J, Kandziora F, Haas N, Raschke M. Synergistic effect of IGF-I and TGF-1 on fracture healing in rats - Single versus combined application of IGF-I and TGF- β 1 -. *Acta Orthop Scand* 74: 604-10, 2003.

Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas N, Raschke M. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *Journal of Orthopaedic Research* 22 (2004) 514 – 519

Schumacher B, Albrechtsen J, Keller J, Flyvbjerg A, Hvid I. Periosteal insulin-like growth factor I and bone formation. Changes during tibial lengthening in rabbits. *Acta Orthop Scand* 67: 237-41, 1996.

Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 22: 410-6, 1998.

Sorensen TS, Sorensen AI, Merser S. Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand* 61: 353-6, 1990.

Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, Smith LP, Longaker MT. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C72-C80, 2001.

Spencer EM, Liu CC, Si EC, Howard GA. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone* 12: 21-6, 1991.

Takaoka K, Koezuka M, Nakahara H. Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9: 902-7, 1991.

Terrell TG, Working PK, Chow CP, Green JD. Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits. *Int Rev Exp Pathol* 34 Pt B: 43-67, 1993.

Thaller SR, Dart A, Tesluk H. The effects of insulin-like growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg* 31: 429-33, 1993.

Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Holmes R. Effect of insulin-like growth factor-1 on zygomatic arch bone regeneration: A preliminary histological and histometric study. *Ann Plast Surg* 31: 421-8, 1993.

Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA. Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 1101-12, 1991.

Trippel S, Coutts R, Einhorn T, Mundy R, Rosenfeld R. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg* 78A: 1272-86, 1996.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150[698], 893-899. 1965.
Ref Type: Abstract

Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1828-32, 1979.

van den Eijnden-van Raaij AJ, Koornneef I, van Zoelen EJ. A new method for high yield purification of type beta transforming growth factor from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 16-23, 1988.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci* 87[6], 2220-2224. 1990.

Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li XJ. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* 13: 1483-90, 1998.

Wildemann B, Kandziora F, Krummrey G, Palaschies N, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release* 95: 249-56, 2004.

Wildemann B, Sander A, Schwabe P, Lucke M, Stockle U, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials* 26: 4035-40, 2005.

Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Huning M, Stange R, Haas NP, Raschke M. Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int* 74: 388-97, 2004.

Wilton P. Treatment with recombinant human insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome). *Acta Paediatr Suppl* 383: 137-42, 1992.

Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 35: 181-90, 1997.

6.2 *Abbildungsverzeichnis*

- Abbildung 1: Die überlappenden Phasen der komplexen Frakturheilung. Abbildung nach Hadjiargyrou et al. 2002.
- Abbildung 2: Die Enantiomere des Milchsäuremoleküls
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Poly(D,L-Laktid) (PDLLA)
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Frakturmaschine
- Abbildung 5: In die Frakturmaschine eingesetzter Hinterlauf der Ratte vor Fraktursetzung
- Abbildung 6: Nagelinsertion
- Abbildung 7: Postoperative Röntgenaufnahme in zwei Ebenen
- Abbildung 8: In die Formen eingebettete Tibia
- Abbildung 9: Eingebettete Tibia, welche in die Testmaschine eingespannt ist.
- Abbildung 10: Beispielmessdaten einer frakturierten Tibia
- Abbildung 11: Färbung einer Tibia nach von Kossa
- Abbildung 12: Färbung mit Safranin O/Lichtgrün
- Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Bildanalyseprogramm I
- Abbildung 14: Ausschnitt aus dem Bildanalyseprogramm II
- Abbildung 15: Ausschnitt aus dem Bildanalyseprogramm III
- Abbildung 16: Röntgenbilder im Verlauf. Ratte aus der Kontrollgruppe.
- Abbildung 17: Röntgenbilder im Verlauf. Ratte aus der PDLLA-Gruppe.
- Abbildung 18: Röntgenbilder im Verlauf. Ratte aus der WF-Gruppe.
- Abbildung 19: Röntgenbilder 12 Wochen nach OP. Exemplarischer Gruppenvergleich.
- Abbildung 20: Messungen der Tibiae einer Ratte aus der Kontrollgruppe
- Abbildung 21: Maximales Drehmoment
- Abbildung 22: Torsionale Steifigkeit
- Abbildung 23: Tibia aus der Kontrollgruppe in Safranin O/Lichtgrün und in von Kossa-Färbung
- Abbildung 24: Tibia aus der PDLLA-Gruppe in Safranin O/Lichtgrün und in von Kossa-Färbung
- Abbildung 25: Tibia aus der WF-Gruppe in Safranin O/Lichtgrün und in von Kossa-Färbung
- Abbildung 26: Vergleich des maximalen Drehmoments zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP.

Abbildung 27: Vergleich der torsionalen Steifigkeit zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP.

Abbildung 28: Vergleich der Knorpelfläche pro periostaler Kallusfläche zu den Zeitpunkten 4, 6 und 12 Wochen nach OP

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Gruppen

Tabelle 2: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung

Tabelle 3: Schema zur Entplastung der histologischen Schnitte

Tabelle 4: Schema zur Versilberung nach von Kossa

Tabelle 5: Schema zur Färbung mit Safranin O/Lichtgrün

Tabelle 6: Ausfälle in der Gruppe Biomechanik

Tabelle 7: Ausfälle in der Gruppe Histomorphometrie

Tabelle 8: Gewicht [g] der Ratten im Verlauf

Tabelle 9: Temperatur [°C] der Ratten im Verlauf

Tabelle 10: Radiologische Auswertung 4 Wochen postoperativ

Tabelle 11: Radiologische Auswertung 6 Wochen postoperativ

Tabelle 12: Radiologische Auswertung 12 Wochen postoperativ

Tabelle 13: Baseline

Tabelle 14: Kortikalis

Tabelle 15: Gesamtkallus

Tabelle 16: Endostaler Kallus

Tabelle 17: Periostaler Kallus

7 Anhang

7.1 *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. med. Haas möchte ich als Direktor des Centrums für muskuloskeletale Chirurgie für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung forschen zu können. Genauso danke ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda, Direktor des Julius Wolff Instituts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier für die Vergabe des Dissertationsthemas, für die sehr gute Betreuung und Unterstützung durch alle Phasen meiner Doktorarbeit. Ebenso möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann herzlich bedanken, die mir während des experimentellen Teils als auch in der Schreibphase immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Während der Versuche konnte ich jederzeit von ihrem Wissen profitieren und mich mit Fragen an sie wenden. Danke für die ausgezeichnete Unterstützung und Geduld.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der unfallchirurgischen Forschungsabteilung bedanken, die mich freundlich, hilfsbereit und mit viel Verständnis in die Arbeitsmethoden eingeführt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern. Die immerwährende Unterstützung, das große Vertrauen, die Motivation und der unermüdliche, nicht enden wollende Ansporn waren mir sowohl während der Universitätszeit als auch in meinem weiteren Leben eine große Hilfe. Sie ermöglichten mir ein wunderschönes Studium, in dem ich nicht nur im medizinischen Bereich meinen Horizont erweitern konnte, sondern auch glücklicherweise meine Ehefrau kennen lernte. Meiner Ehefrau und großen Liebe Corinna danke ich für die allzeit bereite Unterstützung. Sie stand mir ebenfalls motivierend zur Seite und hielt mir in entscheidenden Phasen den Rücken für die Arbeit frei. Des Weiteren konnte ich von ihrem ausgezeichneten Talent für Formulierungen und für die deutsche Sprache profitieren. Danke.

7.2 Curriculum vitae

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

Erklärung an Eides statt

Ich, Daniel Ostapowicz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Langzeitwirkung der lokalen Applikation von IGF-I und TGF- β 1 auf die Frakturheilung – Eine biomechanische und histomorphologische Untersuchung am Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

7.3 Publikationsliste

An folgenden Stellen wurden die Ergebnisse beziehungsweise Teile der Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt:

Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas N, Raschke M.
Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors.
Journal of Orthopaedic Research 22 (2004) 514 - 519

Schmidmaier G; Wildemann B; Ostapowicz D; Melis B; Haas NP; Raschke M.
Time course of unstimulated and growth factor (IGF-I and TGF- β 1) stimulated rat tibial healing.
Vortrag auf dem 7th World Biomaterials Congress, Sydney (Australien) 17.-21.05.2004

7.4 Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
BMP	Bone morphogenetic protein
FGF	Fibroblast growth factor
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
h	Stunde(n)
IGFBP	IGF-binding protein(s)
IGF-I	Insulin-like growth factor I
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt, Einheit der Röhrenspannung beim Röntgengerät
mA/s	Miliampere pro Sekunde, Einheit der Belichtungszeit beim Röntgengerät
mg	Miligramm
min	Minuten
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mol/l	Konzentration in Mol pro Liter
Nmm	Drehmoment in Newtonmilimeter bei der torsionalen Testung
Nmm/°	Newtonmilimeter pro Grad, Einheit für die Steifigkeit des Knochens
Ns	Newtonsekunde, Einheit des Impulses
PDGF	Platelet derived growth factor
PDLLA	Poly(D,L-Laktid) = Polymer der Milchsäure
rh-IGF-I	rekombinanter humaner Insulin-like growth factor I
rh-TGF-β1	rekombinanter humaner Transforming growth factor β1
ROI	Region of interest
TGF-β1	Transforming growth factor β1
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WF	Wachstumsfaktor(en)