Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

EINFLUSS DER LOKALEN APPLIKATION VON WACHSTUMSFAKTOREN AUS EINER BIODEGRADIERBAREN POLY(D,L-LAKTID)-BESCHICHTUNG VON BIOMATERIALIEN AUF DIE FRAKTURHEILUNG

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Chirurgie

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dr. med. Gerhard Schmidmaier

geboren am 14.12.1970 in München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Univ.-Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Univ.-Prof. Dr. med. Tim Pohlemann

eingereicht: Juli 2003

Zusammenfassung - Deutsch

Wachstumsfaktoren sind wichtige Steuerelemente des Knochenzellmetabolismus. Im Verlauf der Frakturheilung kommt es zur Ausschüttung von zahlreichen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Botenstoffen im und um den Bereich des Frakturspalts, die systemisch oder lokal, endokrin, parakrin oder autokrin wirksam werden können. Für verschiedene Wachstumsfaktoren konnten in zahlreichen Studien osteoinduktive und die Frakturheilung positiv beeinflussende Wirkungen nachgewiesen werden. In vitro und in vivo Studien belegen, dass einige dieser Faktoren wie Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) und Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen und somit die Knochenheilung stimulieren. Der genaue Wirkmechanismus dieses positiven Effektes der Wachstumsfaktoren und ihre Interaktion im Verlauf der Frakturheilung ist nicht bekannt.

Die lokale Applikation der Faktoren für einen therapeutischen Einsatz bei der Frakturheilung stellte bisher jedoch ein Problem dar.

Mit der entwickelten biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Implantaten können eingearbeitete Wachstumsfaktoren kontrolliert und lokal direkt an der Fraktur freigesetzt werden. Das beschichtete Implantat dient dabei der Stabilisation der Fraktur und gleichzeitig als Wirkstoffträger. Die Beschichtung weist eine hohe mechanische Stabilität auf. Die eingearbeiteten Wachstumsfaktoren behalten ihre biologische Aktivität in der Beschichtung und werden kontrolliert lokal freigesetzt.

Um den Effekt lokal applizierter Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung zu untersuchen, wurde ein standardisiertes geschlossenes Frakturmodell entwickelt, das der klinischen Situation möglichst nahe ist und reproduzierbar durchgeführt werden kann.

Untersucht wurde der Effekt der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF-beta1 und BMP-2 und des Trägermaterials PDLLA sowie lokale und systemische unerwünschte Wirkungen.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikant grösseren stimulierenden Effekt von IGF-I auf die Frakturheilung im Vergleich zur TGF-beta1 Applikation. Die kombinierte Gabe beider Faktoren ergab einen signifikant grösseren Effekt auf die torsionale Stabilität und die Kallusreifung im Vergleich zur Einzelapplikation. Beide Faktoren scheinen einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung zu haben. Die lokale Applikation von BMP-2 beschleunigte ebenso, wie die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF-beta1 die Frakturheilung signifikant. Deutliche Unterschiede zwischen IGF-I / TGF-beta1 und BMP-2 konnten nicht festgestellt werden.Allerdings zeigte sich bei der Verwendung von BMP-2 auch ausserhalb der Frakturzone eine grössere Mineralisation der Kortikalis, die bei IGF-I / TGF-beta1 nicht zu beobachten ist. Auch im Grosstiermodell bestätigte sich die Wirksamkeit dieser bioaktiven Oberflächen-beschichtung auf die Osteotomieheilung. Die PDLLA-Beschichtung alleine, ohne eingearbeitete Wachstumsfaktoren, zeigte bereits einen positiven Effekt auf die Frakturheilung.

Die Untersuchungen belegen, dass die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten die Frakturheilung signifikant beschleunigt, wobei keine unerwünschten lokalen oder systemischen Wirkungen beobachtet werden konnten.

Bei dem Vergleich lokaler (durch Wachstumsfaktoren) mit systemischer Stimulationsmöglichkeit (durch Wachstumshormon) der Frakturheilung lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die kombinierte Anwendung beider Stimulationsmöglichkeiten zu keiner weiteren Steigerung der Heilungsvorgänge führte. Weitere Untersuchungen wurden hinsichtlich der genauen Rolle und Interaktion der Wachstumsfaktoren durchgeführt. Vor allem die Frühphase scheint hierbei eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung einzunehmen. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Stimulation der Osteoblastendifferenzierung mit einer Erhöhung der Kollagen-1 Produktion in vitro sowie eine Steigerung der Proliferationsrate und Angiogenese mit einem schnelleren Ablauf der Phasen der Frakturheilung in vivo durch lokal appliziertes IGF-I und TGF-beta1.

Weitere Anwendungen der entwickelten Beschichtungstechnologie stellen die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten PDLLA-Cages bei der intervertebralen Spondylodese sowie die lokale Applikation von Antibiotika aus einer PDLLA-Beschichtung von Implantaten zur Prophylaxe der Implantat-assoziierten Osteomyelitis dar.Basierend auf diesen Ergebnissen steht der Einsatz PDLLA-Gentamicin beschichteter intramedullärer Tibianägel kurz vor der klinischen Anwendung.Eine Zulassung durch die entsprechenden Behörden ist erfolgt.Die klinische Anwendung Wachstumsfaktoren-beschichteter Implantate ist bereits in der Vorbereitung.

Schlagwörter: Wachstumsfaktoren, Frakturheilung, Polylaktid, Implantatbeschichtung, Wirkstoffträger, IGF-1, TGF-beta 1, BMP-2

Abstract – English

Growth factors are important regulators of bone metabolism. During fracture healing many growth factors or cytokines were locally released at the facture site. In several studies, different growth factors demonstrated osteoinductive and fracture stimulating properties. In vitro and in vivo studies showed a stimulating effect of Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on osteo- and chondrogenetic cells. The exact effectiveness and the interaction of these growth factors during fracture healing is not known so far. Further, the local application of these factors for therapeutically use in fracture treatment is still a problem.

The developed biodegradable poly(D,L-lactide)-coating of implants allows the local and controlled release of incorporated growth factors directly at the fracture site. The coated implant serves on the one hand for fracture stabilization and on the other hand as a drug delivery system. The coating has a high mechanical stability. The incorporated growths factors remain biologically active in the coating and were released in a sustained and controlled manner.

To investigate the effect of locally released growth factors IGF-I, TGF-beta1 and BMP-2 and the carrier PDLLA on fracture healing, standardised closed fracture models were developed with a close relationship to clinical situation. Further, possible local and systemic side effects were analysed.

The results demonstrated a significantly higher stimulating effect of IGF-I on fracture healing compared to TGF-beta1. The combined application of both growth factors showed a synergistic effect on the mechanical stability and callus remodeling compared to single treatment.

The local release of BMP-2 also enhanced fracture healing significantly – comparable to combination of IGF-I and TGF-beta1. However, a higher rate of mineralisation was measurable outside the fracture region using BMP-2 in a rat fracture model.

Using a large animal model on pigs with a 1 mm osteotomy gap, the effectiveness of locally released growths factors could be confirmed. Further, the PDLLA-coating without any incorporated growth factors demonstrated a significantly effect on healing processes in both models. These investigations showed, that the local release of growth factors from PDLLA coated implants significantly stimulate fracture healing without any local or systemic side effects.

Comparing systemic with local stimulation techniques, we found an improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of IGF-I and TGF-beta1. However, the combined use of both simulation techniques did not lead to a further increase of healing processes.

Investigations on the effectiveness and the interaction of growth factors during fracture healing demonstrated an dramatic effect in the early phases of healing processes. The growth factors stimulate the differentiation of osteoblasts with a higher production of collagen I in vitro and increase osteogenesis and vascularisation of the fracture callus in vivo.

Further applications of the coating technology are the use of PDLLA and growth factor coated cages for the stimulation of intervertebral fusion and the use of PDLLA and Gentamicin coated implants in order to prevent implant associated infections.

The clinical use of antibiotic and growth factor coated implants are in preparation.

Keywords: growth factors, fracture healing, polylactide, implant coating, drug carrier, IGF-1, TGF-beta 1, BMP-2

für Joanna

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	10
1.1	Frakturheilung	10
1.1.1	Phasen der indirekten Frakturheilung	10
1.1.2	Probleme der Frakturheilung	12
1.1.3	Beeinflussung der Frakturheilung	14
1.2	Wachstumshormon	14
1.3	Wachstumsfaktoren	16
1.3.1	Lokalisation der Wachstumsfaktoren im Knochen	17
1.3.2	Wachstumsfaktor-Rezeptoren	17
1.3.3	Biologische Wirkung der Wachstumsfaktoren	19
1.3.4	Insulin-like growth factors	20
1.3.4.1	Einteilung	20
1.3.4.2	Steuerung IGF	20
1.3.4.3	Biologische Wirkungen von IGF-I	21
1.3.5	Transforming growth factors	24
1.3.5.1	Einteilung	24
1.3.5.2	Steuerung TGF-ß1	25
1.3.5.3	Biologische Wirkungen von TGF-ß	26
1.3.6	Kombination von IGF-I und TGF-ß1	28
1.3.7	Bone morphogenetic proteins	29
1.3.7.1	Einteilung	29
1.3.7.2	BMP Rezeptoren und Signaltransduktion	30
1.3.7.3	Biologische Wirkungen von BMPs	31
1.4	Möglichkeiten der Applikation von Wachstumsfaktoren	31
1.4.1	Anforderungen an lokale Applikationssysteme	33
1.4.2	Mit Wachstumsfaktoren beschichtete Implantate	34
1.4.3	Biodegradierbare Trägermaterialien	34
1.4.3.1	Poly(D,L-Laktid) (PDLLA)	35

1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen 36

2 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN 37

2.1 Entwicklung einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung für Biomaterialien zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren 37

2.2 Entwicklung eines Frakturmodells an der Ratte 38

2.3 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1 auf die Frakturheilung der Ratte 39

2.4 Untersuchung der lokalen Applikation von BMP-2 auf die Frakturheilung der Ratte 40

2.5 Der Einfluss der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1auf die Osteotomieheilung im Schweinemodell 41

2.6 Effekt der systemischen Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur lokalen Wachstumsfaktorengabe 42

2.7 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Osteoblastenaktivität und Kollagenproduktion in vitro 43

2.8 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Differenzierung in vivo 44

2.9 Osteogenese und Vaskularisation im Verlauf der Frakturheilung bei lokaler Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 45

2.10 Quantifizierung, Lokalisation und Expression von Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung 46

3 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER ERGEBNISSE 47

3.1 Entwicklung einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung für Biomaterialien zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren 47

3.2 Entwicklung eines Frakturmodells an der Ratte 49

3.3 Effekt der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung 51
3.3.1 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 auf die Frakturheilung der Ratte 51
3.3.2 Untersuchung des Langzeiteffektes lokal applizierter Wachstumsfaktoren 54
3.3.3 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1 auf die Osteotomieheilung beim Schwein 55

3.4 Effekt der systemischen Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur lokalen Wachstumsfaktorengabe 56

3.5 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Differenzierung in vitro und in vivo 58

3.6 Osteogenese und Vaskularisation im Verlauf der Frakturheilung bei lokaler Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 59

3.7 Quantifizierung, Lokalisation und Expression von Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung 61

3.8 Weitere Anwendungen der entwickelten Beschichtungstechnologie 62
3.8.1 Lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten PDLLA-Cages bei der intervertebralen Spondylodese 62
3.8.2 Lokale Applikation von Antibiotika aus einer PDLLA-Beschichtung von Implantaten zur Prophylaxe der Implantat-assoziierten Osteomyelitis 63

3.9 Klinische Relevanz 64

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 66

1 EINLEITUNG

1.1 Frakturheilung

Die physiologische Frakturheilung ist ein komplexer Vorgang, an dem verschiedene Zellen und Gewebetypen beteiligt sind. Es kommt hierbei zur Ausbildung eines die Fraktur überbrückenden Kallus, der sich aus Bindegewebe, Knorpel und Knochenzellen zusammensetzt. Die Bildung und Reifung des Heilungsgewebes wird durch komplexe Interaktionen von Hormonen, Cytokinen, extrazellulären Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren reguliert [63]. Die Frakturheilung kann in eine direkte und in eine indirekte Frakturheilung untergliedert werden. Bei der direkten Knochenbildung, der desmalen Ossifikation, geht die gebildete Knochensubstanz unmittelbar aus dem mesenchymalen Gewebe hervor und wird als Bindegewebsknochen bezeichnet. Im Gegensatz dazu entsteht bei der indirekten Knochenbildung (chondrale Ossifikation), die am häufigsten zu beobachten ist, zunächst eine Knorpelmatrix, die schrittweise abgebaut und von Knochengewebe ersetzt wird. Bemerkenswert ist, dass im Unterschied zu anderen Geweben, die durch Ausbildung einer bindegewebigen Narbe heilen, bei der Frakturheilung das ursprüngliche Gewebe und dessen Funktion nahezu vollständig wiederhergestellt werden kann [143].

1.1.1 Phasen der indirekten Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung lässt sich in fünf teilweise überlappende Phasen unterteilen [63]:

- Verletzungs-/Frakturphase mit Hämatombildung
- Entzündungsphase
- Angiogenese und Chondrogenese
- Chondrale und desmale Ossifikation
- Phase des Umbaus (sog. „modeling“ und „remodeling“)

Die *Frakturphase* umfasst die Zerstörung des Knochens und des umgebenden Gewebes. Hierbei werden Kortikalis, Knochenmark, Periost und angrenzende Weichteile geschädigt. Im Frakturbereich kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms [18]. In dieses Hämatom infiltrieren in der anschließenden *Entzündungsphase* lokal Granulozyten, Mastzellen und Monozyten. Des weiteren finden sich pluripotente Stammzellen mesenchymaler Herkunft als Vorläufer der Osteoblasten.

Es kommt zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (u.a. TGF-β1, PDGF) und Cytokinen (u.a. Interleukin 1 und 6), die für die Steuerung der Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung eine zentrale Rolle spielen und als Signalstoffe den Heilungsprozess entscheidend beeinflussen [63].

2-3 Tage nach Abklingen der Entzündungsphase kommt es entlang der extrazellulären Matrix zum Aufbau von Granulationsgewebe. Dieser Vorgang erstreckt sich über einen Zeitraum von ca. 4-6 Wochen und wird unter anderem von folgenden lokal wirksamen Wachstumsfaktoren gesteuert:

- Bone morphogenetic proteins (BMPs)
- Transforming growth factors (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3)
- Insulin-like growth factors (IGF-I, IGF-II)
- Fibroblast growth factors (aFGF, bFGF)
- Platelet derived growth factor (PDGF)
- Bone derived growth factor (β_2-Mikroglobulin).

Granulationsgewebe aus Fibroblasten, Kapillaren und Kollagen Typ I beginnt das Frakturhämatom zu ersetzen. Schon in der frühen Phase der Frakturheilung entstehen Mineraldepots. Nach 4-6 Wochen liegt ein sogenannter weicher Kallus vor, der von peripher nach zentral zur Frakturzone fortschreitet. Einen bedeutenden Beitrag zur Ausbildung des weichen Kallus und zum Ablauf der desmalen Ossifikation leisten hierbei die Mesenchym- und Osteoprogenitorzellen des Periosts, die sich, beeinflusst durch die bereits oben genannten Wachstumsfaktoren, zu Knorpelzellen oder Osteoblasten differenzieren [112]. Zur Förderung der Osteoblastenproliferation sezernieren Makrophagen Matrixproteine wie Osteokalzin und Bone morphogenetic proteins (BMPs). „Basic multicellular units“ (BMU), zusammengesetzt aus osteogenen und osteoklasteren Zellen, sind für den Abbau des zerstörten Knochens bis hin zur Entstehung einer ersten neuen Knochenstruktur - dem Geflechtknochen - verantwortlich. Die indirekte Frakturheilung zeigt im zentralen Frakturbereich primär keine Knochenneubildung, da zunächst Makrophagen und Osteoklasten den nekrotischen Knochen abbauen. Später finden sich in diesem Bereich chondroide Zellen, Chondroblasten und Osteoblasten. Sobald die Frakturenden durch den weichen Kallus Kontakt haben, beginnt mit zunehmender Mineralisation der Grundsubstanz die Kallushärtung. Nach 3-4 Monaten ist ein Geflechtknochen entstanden, welcher durch (Re-)Modelingvorgänge eine allmähliche Umwandlung in lamellären Knochen erfährt. Zum Abschluss der Umbauvorgänge entsteht aus dem Geflechtknochen wieder ein Lamellenknochen mit Periost und Endost. Die Phase des Remodelings beinhaltet die Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur mit Markraum und sollte bei regelhaftem Heilungsverlauf nach 6-24 Monaten abgeschlossen sein.

1.1.2 Probleme der Frakturheilung

Klinische Erfahrungen zeigen, dass es bei Frakturen zu einschneidenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen und sozioökonomischen Problemen für den Patienten kommen kann. Störungen der Frakturheilung können *traumatisch*, *mechanisch* und *biologisch* bedingt sein. Eine Kombination dieser Faktoren ist möglich und häufig zu beobachten. Obwohl unfallchirurgische Therapien in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht haben, ist die Behandlung von Frakturen weiterhin mit zahlreichen Komplikationen und Risiken verbunden [64].

Neben möglichen Operationsrisiken wie Blutverlust, Infektionen, Gefäß- oder Nervenverletzungen, Kompartmentsyndrom und bleibendem Funktionsverlust, korreliert eine Vielzahl der Komplikationen direkt mit der Behandlungsdauer [195]. Abhängig von der Verweildauer im Krankenhaus kann es zu Infektionen durch Krankenhauserreger mit teilweise letalen Krankheitsverläufen kommen. Bei Patienten mit Frakturen der langen Röhrenknochen ist, bedingt durch die lange Immobilisation, in 30-50 % mit dem Auftreten einer proximalen tiefen Beinvenenthrombose zu rechnen. Bei bis zu 5 % dieser Patienten resultiert daraus eine klinisch relevante Lungenembolie [52]. Bis zu 5 % der Frakturen an der unteren Extremität heilen nur verzögert aus oder verbleiben als Pseudarthrosen [126]. Es werden hierbei *atrophe* mit geringem Reparationsgewebe von *hypertrophen* Pseudarthrosen mit überschießendem, nicht durchbauendem Reparationsgewebe unterschieden. Letztere sind häufig mechanisch bedingt. Es besteht eine zu große Mobilität der einzelnen Fragmentenden zueinander, z.B. durch Fehlbelastungen oder ungenügende Stabilisierung hervorgerufen. Der aus dem Kallus entstehende Geflechtknochen zerreißt immer wieder, eine Überbrückung des Frakturspaltes durch auswachsende Haverssche Systeme wird verhindert. Atrophe Pseudarthrosen beruhen meist auf biologischen Störungen, welche die Heilung in einer oder in mehreren Phasen zugleich stören können. Mangelnde Gefäßeinsprossung und Weichteilschäden mit konsekutiv verzögerter Heilung können ursächlich daran beteiligt sein [126]. Darüber hinaus kann die Kallusbildung durch die Einnahme von Medikamenten, wie z.B. Steroide, Zytostatika oder nichtsteroidale Antirheumatika beeinträchtigt werden. Weitere aber seltenere biologische Ursachen einer gestörten Knochenheilung sind Mineralisationsfehler, Fehldifferenzierungen der beteiligten Zellen und Fehler des „modeling“ und „remodeling“.

Im Zuge einer immer älter werdenden Bevölkerung spielen heutzutage infolge von Osteoporose entstehende Frakturen zunehmend eine Rolle. Diese Frakturen heilen schlecht und stellen eine entscheidende Ursache von Morbidität und Mortalität bei älteren Menschen dar. Studien haben die Beziehung zwischen dem Alter der Bevölkerung und dem Risiko an einer Fraktur zu erkranken untersucht. Es zeichnet sich ein rasanter Bevölkerungsanstieg ab, während 1950 ca. 2,5 Milliarden Menschen auf der Erde lebten, waren es 1998 bereits 5,9 Milliarden. Die Prognose für das Jahr 2050 beläuft sich auf 9 Milliarden Menschen. 1997 waren 380 Millionen Menschen über 65 Jahre alt, 2020 sollen es global 690 Millionen sein. In der Altersgruppe 5-17 Jahre kommt es am

häufigsten zu Frakturen an den Extremitäten, bei Menschen über 65 Jahre nehmen Hüftfrakturen den obersten Rang ein. Angesichts der Tatsache, dass die Bevölkerungszahlen in den kommenden Jahren immer weiter zunehmen, steigen auch die Zahlen der auftretenden Frakturen weiter an (Knowledge Enterprises Inc. 2000).

Auf Grund der zunehmenden Bedeutung von Erkrankungen des Bewegungs- und Stützapparates hat die WHO im Jahre 2000 die *„Bone and Joint Decade“* ausgerufen.

1.1.3 Beeinflussung der Frakturheilung

Seit vielen Jahren wird versucht, die Frakturheilung mittels lokal oder systemisch wirkenden Faktoren zu beschleunigen. Die oben genannten Probleme könnten durch eine Stimulation der Frakturheilung reduziert werden. Einen möglichen Lösungsansatz stellt hierbei der Einsatz von Hormonen oder Wachstumsfaktoren dar. Positive Effekte konnten bereits bei der systemischen Anwendung von Wachstumshormon im Bereich der Distraktionsosteogenese und der Knochendefektheilung in experimentellen Studien nachgewiesen werden [180, 182]. Derzeit wird der Einsatz von systemisch appliziertem Wachstumshormon bei der Frakturheilung in einer klinischen Studie untersucht. Für den Patienten würde der Einsatz von Wachstumshormon oder Wachstumsfaktoren und die damit verbundene Beschleunigung der Frakturheilung eine Verringerung der frakturbedingten Folgeoperationen bedeuten sowie eine Verkürzung der Behandlungsperiode mit einem frühzeitigeren Wiedererlangen der Arbeitsfähigkeit, Reduzierung der Erwerbsminderung oder Frühberentung und damit einen großen Gewinn an Lebensqualität darstellen. Zugleich könnten die Kosten für das Gesundheitswesen (Krankenhausaufenthalt, Nachbehandlung, Hilfsmittel) gemindert werden.

1.2 Wachstumshormon

Wachstumshormon (GH) wird vom Hypophysenvorderlappen gebildet und in einem circadianen Rhythmus freigesetzt. Durch seine stimulierende Wirkung ist GH beim Erwachsenen an Remodeling-Vorgängen der Knochensubstanz beteiligt [68]. Den ursächlichen Mechanismus untersuchte u.a. Green [84] und konnte zwei Stimulationswege aufzeigen. Zum einen bewirkt GH direkt die Differenzierung von Knorpelvorläuferzellen zu Chondrozyten, zum anderen fördert es indirekt die Proliferation der eben genannten Zelltypen, indem es die Produktion von IGF-I anregt. Diese bidirektional kontrollierte Gewebebildung durch GH wird als *„dual effector theory“* bezeichnet [84].

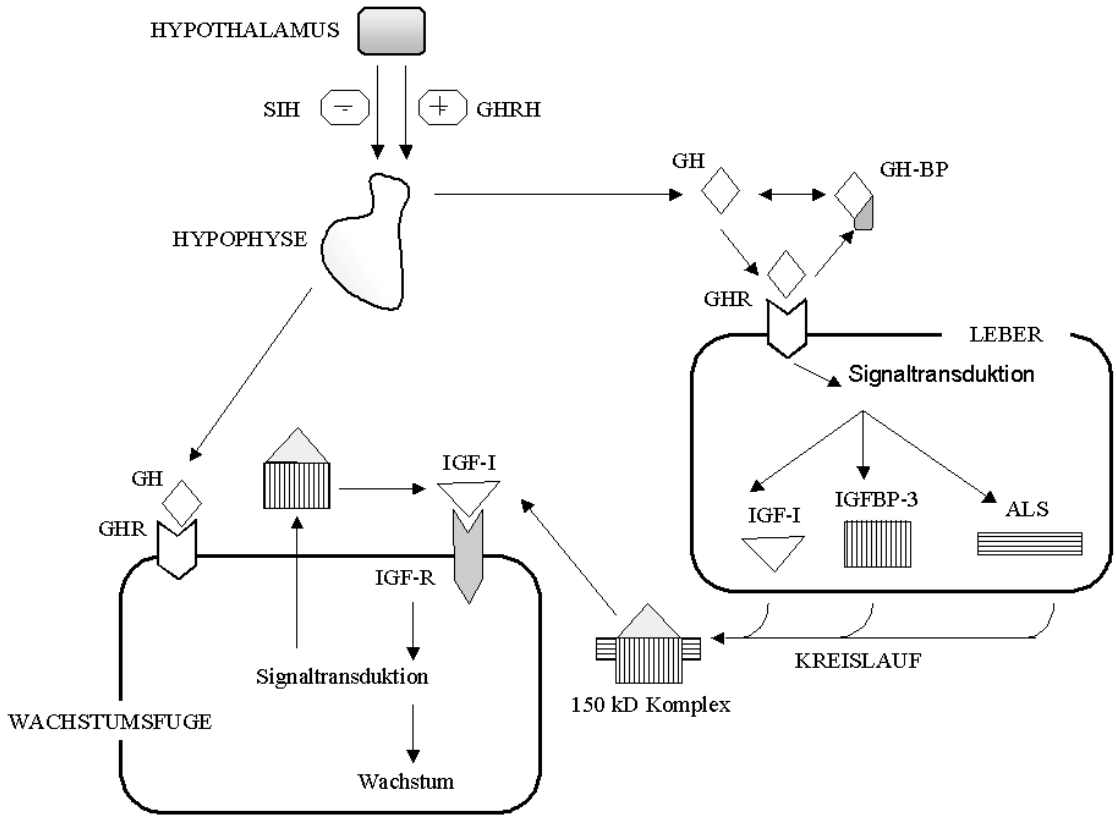

Abb. 1: Schematische Darstellung des GH-IGF-Regelkreises

Im Hypothalamus werden Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) und Somatostatin (SIH) gebildet. GHRH stimuliert, SIH hemmt die Freisetzung von GH aus der vorderen Hypophyse. Gekoppelt an ein Bindungsprotein (GH-BP) gelangt GH in den Kreislauf und bindet an spezifischen Rezeptoren an den Leberzellen. Die Interaktion mit diesen Rezeptoren aktiviert in den Zellen die Synthese von IGF-I und IGF-I-Bindungs-Protein-3 (IGFBP-3), welches maßgeblich für dessen Transport zuständig ist. Ein zweites Transportprotein, Acid Labile Subunit (ALS) genannt, bildet mit IGF-I und IGFBP-3 einen Dreierkomplex (150kD), der IGF-I zu dessen Zielzellen, wie Chondrozyten der Wachstumsfuge, transportiert. Dort wird IGF-I auf membranständige Rezeptoren (IGF-R) übertragen. Dies löst eine Kaskade intrazellulärer Reaktionen aus, die für Reifung und Teilung der Zellen verantwortlich sind. Zudem bindet GH auch direkt an Rezeptoren auf Chondrozyten der Wachstumsfuge und regt in diesen Zellen die lokale Bildung von IGF-I an. Modifiziert nach Trippel [249].

In zahlreichen in vitro und in vivo Studien wurde die Wirkungsweise von GH untersucht. Wachstumshormon kann über eine direkte Osteoblastenstimulation das Längenwachstum des Knochens von Ratten steuern [94, 95]. Eine durch Wachstumshormon bedingte direkte Stimulation der Proliferation von Chondrozytenkulturen aus dem Ohrknorpel von Kaninchen sowie aus dem Rippenknorpel der Ratten konnte ebenfalls nachgewiesen werden [133]. In humanen Zellkulturen zeigte sich eine durch Wachstumshormon hervorgerufene Proliferation von osteoblastenartigen Vorläuferzellen [103].

Die Untersuchungen über den Einfluss von GH auf die Frakturheilung führten zu kontroversen Ergebnissen. In einigen Studien konnte eine Beschleunigung der Frakturheilung beobachtet werden [13, 15, 16, 156], während andere Autoren keinen Effekt auf die Kallusformation beschreiben [40], bei denen jedoch kein spezies-spezifisches Hormon verwendet wurde.

Vorstudien konnten einen stimulierenden Einfluss von systemisch appliziertem spezies-spezifischen-rekombinanten GH auf die Distraktionsosteogenese und Knochendefektheilung am Schwein nachweisen [11, 180, 182].

1.3 Wachstumsfaktoren

1920 vermutete Bier, dass die Frakturenden des Knochens ein „Agens“ freisetzen, das den Heilungsprozess positiv beeinflusst [24]. Von diesem Zeitpunkt an wird die Suche nach dem einzigartigen „Wund-Hormon“, speziell im Frakturhämatom, fortgesetzt. Levander entdeckte 1938, dass die intramuskuläre Injektion eines Extrakts von in saurem Alkohol gelöstem Knochen und Kallus die Bildung heterotopen Knochen- und Knorpelgewebes auslöst.
Er schlussfolgerte, dass die Knochenregeneration ein Resultat der Aktivierung undifferenzierten mesenchymalen Gewebes durch spezifische knochenbildende Substanzen sei [114]. 1965 gelang es Urist erneut mittels eines Extrakts aus demineralisiertem Knochen ektopische Knochensubstanz zu erzeugen [254]. Diese Beobachtungen lösten in der Folge zahlreiche Untersuchungen zur Erforschung der lokalen Knochenstimulation durch extrazelluläre Matrix aus, in deren Verlauf einige Wachstumsfaktoren (WF), als erstes Bone morphogenic protein-2 (BMP-2), entdeckt wurden.

WF sind Polypeptide, die generalisiert, in sehr kleinen Konzentrationen, in spezifischen Geweben gebildet werden und als lokale Faktoren der Zellregulation fungieren. Die meisten WF werden als hochmolekulare Vorstufen freigesetzt, die durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form mit niedrigem Molekulargewicht überführt werden. Im Folgenden soll auf für den Knochenstoffwechsel bedeutende WF näher eingegangen werden.

1.3.1 Lokalisation der Wachstumsfaktoren im Knochen

Knochengewebe enthält Zellen und extrazelluläre Matrix. Letztere besteht zu 35 % aus organischen und zu 65 % aus nichtorganischen Anteilen. Die nichtorganischen Anteile setzen sich hauptsächlich aus Calcium und Phosphat als Hydroxylapatit zusammen [134], während die organischen aus kollagenen und nichtkollagenen Proteinen bestehen.

Typ I Kollagen macht mehr als 90 % des organischen Knochenmaterials aus und ist das wichtigste Strukturprotein des Knochens. Die übrigen 10 % der nichtkollagenen Proteine erfüllen verschiedene regulierende Funktionen. Der Anteil der WF an nichtkollagenen Proteinen des Knochens beläuft sich lediglich auf weniger als 1 % [198]. Dennoch ist der Knochen eine reichhaltige Quelle für osteoinduktive WF. Viele dieser Faktoren werden von Osteoblasten synthetisiert und in der Knochenmatrix gespeichert [20, 97].

1.3.2 Wachstumsfaktor-Rezeptoren

An der Oberfläche ihrer Zielzellen binden WF an spezifische, transmembranöse Rezeptormoleküle und lösen eine Kaskade intrazellulärer Ereignisse aus, die letztlich zur Expression von Genen führen. Diese kodieren für Stoffwechselfunktionen wie Zellteilung und Proteinsynthese [120]. Die Vorgänge an den Rezeptoren ermöglichen so eine Verknüpfung von extra- und intrazellulärer Information. Die An- oder Abwesenheit spezifischer Rezeptoren auf den Zellen legt fest, inwieweit diese Informationen aus dem Extrazellularraum beantworten können. Die Anzahl aktiver Rezeptoren auf der Zelloberfläche passt sich der Stoffwechsellage an. Sie nimmt bei Überschuss der Faktoren ab (Down Regulation) und bei einem Mangel zu (Up Regulation). Jede WF-Familie hat eine eigene korrespondierende Rezeptorfamilie, wohingegen die intrazelluläre Antwort, beispielsweise Zellteilung oder Proteinsynthese, häufig die gleiche ist.

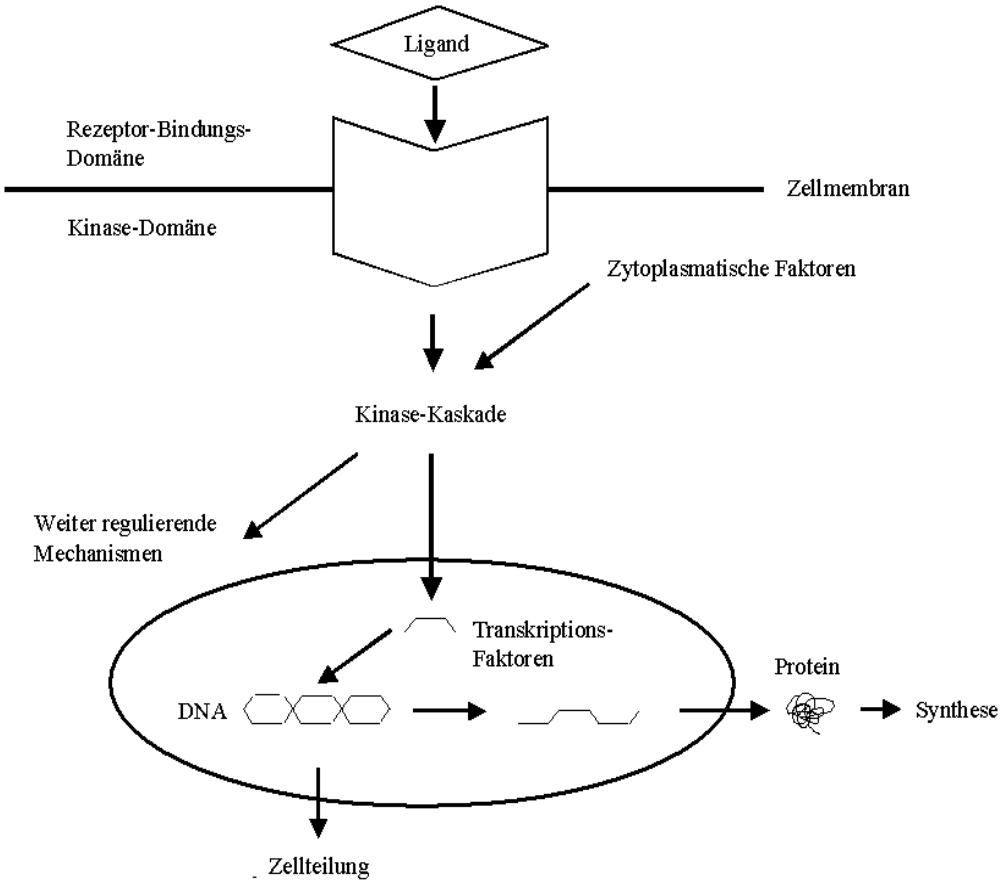

Abb. 2: Regulation der zellulären Antwort durch WF (schematische Darstellung).

Ein Signalmolekül/Ligand (WF) bindet an die extrazelluläre Domäne des WF-Rezeptors. Diese Interaktion aktiviert die intrazelluläre Domäne des Rezeptors. Bei vielen der WF-Rezeptoren werden durch Kinaseaktivität, Phosphatgruppen der Kinase-Domäne auf Proteine übertragen. Im Rahmen der intrazellulären Kommunikation nimmt die Kinaseaktivität eine wichtige Stellung ein. Der aktivierte Rezeptor regt in Zusammenarbeit mit anderen regulierenden Faktoren des Zytoplasmas mehrere Phosphorylierungsschritte, die Kinase-Kaskade, an. Diese Kaskade gipfelt im Nukleolus der Zelle in der Bindung von Transkriptions-Faktoren, welche die Gentranskription in messenger-RNA (mRNA) aktivieren. Die mRNA wird in Proteine translatiert, die im weiteren intrazelluläre Aufgaben erfüllen oder zum Matrixaufbau und anderen Gewebsfunktionen aus der Zelle geschleust werden. Modifiziert nach Trippel [249]

1.3.3 Biologische Wirkung der Wachstumsfaktoren

WF vermitteln an ihren Zielzellen sowohl eigene Effekte, als auch die Wirkung systemischer Hormone wie Parathormon, Vitamin D, Kalzitonin und Wachstumshormon (GH) [38, 179]. Auf Mesenchymzellen, Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten üben WF zahlreiche Effekte aus [199]. In diesen Zellen regulieren sie den Phänotyp durch Differenzierungsvorgänge und beeinflussen die Proliferation und Stoffwechselfunktionen, wie Matrix- und Proteinsynthese [38]. Nach Freisetzung aus der Knochenmatrix sind WF in der Lage, den Metabolismus von Osteoblasten und -klasten während der Remodelingvorgänge zu steuern sowie die Heilungsantwort nach einem Trauma anzuregen und zu kontrollieren [38, 97]. Die Konzentration der im Knochen gespeicherten WF beeinflusst das Ausmaß der Knochenneubildung und Resorption [125]. Die Konzentration der Faktoren im Knochen variiert mit der Lokalisation, den physiologischen Bedingungen und nicht zuletzt dem Alter. Im kortikalen Knochen nehmen die Konzentrationen von IGF-I und TGF-β mit zunehmendem Alter ab [153].

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf der Frakturheilung

Heilungsphase	WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung	Referenz
Inflammation und Hämatom-bildung	BMP-2/4	In mesenchymalen Zellen des Hämatoms und der Kambium-schicht des Periost im Fakturbereich. BMP-4 mRNA zeigt sich in Osteoprogenitorzellen des proliferierenden Periost, der Markhöhle und des Muskels	[30] [152]
	TGF-β1	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periost.	[26] [97]
	PDGF	Von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambium- schicht des Periosts.	[26]/[31]
	aFGF	In Zellen der Kambiumschicht, assoziiert mit einer Zunahme mesenchymaler Zellen.	[31]
Kallusbildung und intra-membranöse Knochen-bildung	BMP-2/4	In Osteoblasten, die den Geflechtknochen nach Fraktur auskleiden. Nimmt mit zunehmender Knochenmasse ab.	[30]
	TGF-β1	In proliferierenden mesenchymalen Zellen, in Osteoblasten und in der Matrix.	[97]
	PDGF	Von Thrombozyten freigesetzt. Stimuliert die intramembranöse Knochenbildung.	[26]
Chondro-genese	BMP-2/4	In Vorläuferzellen, kurz vor deren Reifung zu Chondrozyten.	[30]
	TGF-β1	In mesenchymalen Zellen, jungen und reifen Chondrozyten.	
	IGF-I	In jungen Chondroblasten am Rand des durch Knorpel ersetzten fibrösen Gewebes.	[31]
	AFGF	Gebildet durch Chondrozyten, ihren Vorläufern und Makro-phagen. Stimuliert die Chondrozyten- Proliferation/Reifung.	[26]
Enchondrale Ossifikation	BMP-2/4	Intrazellulär in Osteoblasten der kalzifizierten Knorpelmatrix.	[30]
	TGF-β1	In der Umgebung hypertropher Chondrozyten und in Chondrozyten am Rand der Ossifikationszone.	[31, 97]
	bFGF	Möglicherweise von Chondrozyten gebildet. Wichtig für die enchondrale Ossifikation.	[26]

Modifiziert nach Solheim [225].

1.3.4 Insulin-like growth factors

1.3.4.1 Einteilung

Die Insulin-like growth factors (IGFs), auch Somatomedine, Sulfation-factors oder skeletal growth factors genannt, erfüllen bezüglich des Knochenstoffwechsels wichtige Funktionen. Bislang wurden zwei IGFs charakterisiert, IGF-I (Somatomedin-C; 7,5 kD) und IGF-II (Skeletal growth factor; 8,7 kD) [184]. Die beiden Polypeptide sind zu 60 % homolog [161]. IGF-I ist ein Polypeptid aus 70 Aminosäuren mit drei Disulfidbindungen und wird von einem 90 kb Gen auf Chromosom 12 transkribiert. Beide IGFs verfügen über vergleichbare biologische Wirkungen. IGF-I ist jedoch 4-7-mal wirksamer als IGF-II.

In der Konchenmatrix ist die Konzentration an IGF-II, gefolgt von TGF-β, verglichen mit der anderer WF, die höchste [148]. Die Konzentration von IGF-I ist 10-20-mal niedriger [71]. Die IGFs werden in zahlreichen Gewebszellen, einschließlich der Osteoblasten, synthetisiert [55, 141, 142]. Diese Zellen verfügen auf ihrer Oberfläche auch über spezifische Rezeptoren für IGF-I und -II [224]. IGF-I wird zudem von zahlreichen Zellen gespeichert. Immunreaktivität des Faktors findet sich in Endothelzellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Myozyten. In knochenbildenden Zellen des Periost, im Frakturkallus sowie in ektopen Knochengewebe ist die Expression von IGF relativ hoch [7, 60, 111, 174, 199].

1.3.4.2 Steuerung IGF

Die Serumkonzentration von IGF wird vor allem durch Wachstumshormon (GH) gesteuert [40]. Der WF steuert vor Ort Wachstum und Stoffwechsel der Zellen [95, 157, 203]. Im Serum nimmt die Konzentration an freiem IGF-I mit zunehmendem Alter von 950 ± 150 ng/l (20-30 Jahre) auf 410 ± 70 ng/l (> 60 Jahre) ab [75].

Im Knochengewebe unterliegt die IGF-Synthese außerdem der Beeinflussung durch zahlreiche andere Hormone und Faktoren.

Tabelle 2: Einfluss systemischer Hormone und WF auf die IGF - Synthese im Knochengewebe

Stimulierende Hormone/WF	Hemmende Hormone/WF	Stimulierend und hemmend
Growth Hormone Parathormon Östrogene Prostaglandin E2 BMP-2	Glucokortikoide bFGF PDGF-BB	TGF-β1

[39, 48, 167, 205, 225, 229].

Knochenzellen sezernieren IGF-Bindungsproteine (IGFBPs), die IGF binden und in seiner biologischen Aktivität beeinflussen. Die genaue Rolle der Bindungsproteine ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich verlängern diese die Halbwertszeit von IGF, neutralisieren oder heben seine biologische Aktivität auf und sind für den Transport zu den Zielzellen zuständig [70, 147, 150]. Bislang konnten sechs verschiedene IGFBPs identifiziert werden, IGFBP-1 bis -6, die in ihrer Sequenz zu annähernd 35 % homolog sind [221]. IGFBP-3 und -5 verstärken die Stimulation der Osteoblasten durch IGF [70, 147, 149]. IGFBP-5 bindet fest an Hydroxylapatid und ist deshalb das häufigste IGFBP im Knochen [154].

1.3.4.3 Biologische Wirkungen von IGF-I

IGF vermittelt die systemischen Effekte zahlreicher Hormone [48, 56, 70, 148, 192] und besitzt viele insulinähnliche Eigenschaften [173]. Gemeinsam mit anderen WF reguliert IGF Prozesse des Knochenstoffwechsels wie Entwicklung, Wachstum, Remodeling und Heilung. Der Faktor vermittelt die osteoinduktive Wirkung mechanischen Stresses auf die Knochenstruktur. Nach körperlicher Belastung nimmt die IGF-I-Konzentration in langen Röhrenknochen der Ratte zu. Dieser Konzentrationsanstieg ist mit einer zunehmenden Knochenneubildungsrate assoziiert [178, 274].

Proliferation und Differenzierung

IGF ist ein bedeutendes Mitogen in isolierten Zellsystemen [173]. Der WF übt eine mitogene Wirkung auf Zellen aus, die für Knochenbildung, -remodeling und die Frakturheilung von Bedeutung sind. IGF-I stimuliert Zellteilung und Matrixsynthese in Knorpel-, Knochen-, Sehnen- und Muskelzellen [1, 40, 72]. Der WF induziert eine Zunahme an c-fos mRNA in murinen Osteoblasten. C-fos ist ein Proto-onkogen, das an der Kontrolle von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt ist [145]. In Knochenzellkultur wirkt IGF-I stimulierend auf die Replikation, Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen [38, 91]. Zudem regt IGF Osteoblasten zur Proliferation und Replikation an und erhöht somit die Zahl der funktionsfähigen Zellen, mit der

Fähigkeit Knochenmatrix zu bilden [91, 203]. Weiter übt der Faktor Effekte auf Chondrozyten der Wachstumsfuge aus. Dort kann in proliferierenden Chondrozyten präpubertärer Ratten eine starke Immunreaktivität des Faktors gemessen werden. Durch einen autokrinen Mechanismus stimuliert der WF deren klonale Ausbreitung in der Proliferationszone [158]. In der Wachstumsfuge ist IGF-I regulierend an der enchondralen Ossifikation beteiligt. Anzunehmen ist, dass der WF diesen Vorgang auch während der Frakturheilung beeinflusst.

Kollagen- und Matrixsynthese

Es werden nicht nur proliferative Wirkungen des Faktors beschrieben, sondern auch positive Effekte auf Differenzierungsparameter, wie die Produktion von Osteokalzin, Kollagen Typ I, mRNA und alkalische Phosphatase [38, 69]. Der WF stimuliert den Einbau von Sulfaten in Proteoglycane des Knorpels [173]. In Knochenzellkultur wirkt IGF-I induktiv auf die Protein- und Kollagensynthese durch differenzierte Osteoblasten [38, 39, 91, 149, 190] und hemmt den Kollagenabbau [140, 265]. Dieser Einfluss auf die Kollagensynthese ist nicht nur von einer erhöhten Zellzahl abhängig, sondern scheint auf Transkriptionsebene reguliert zu werden. Unterbindet man die endogenen Aktivitäten des WF mittels IGF-Antikörpern, IGF-Rezeptor-Antikörpern oder hemmender IGF-Bindungsproteine, so kommt es zu einer verringerten Osteoblastenproliferation und Kollagensynthese [4, 148, 149]. Letztendlich führen die Effekte von IGF zu einer Zunahme der Knochenmasse.

Verknüpfung von Knochenneubildung und Resorption

Unter dem Einfluss von IGF kann auch eine zunehmende Bildung und Lebensdauer der Osteoklasten beobachtet werden [90]. In Osteoklasten nachgewiesenes IGF-I fungiert dort möglicherweise als autokriner Regulator [111]. Subkutan injiziertes IGF-I erhöht sowohl die Serumparameter der Knochenneubildung als auch der Resorption (u.a. alkalische und neutrale Phosphatase, Calcium, Phosphat und Osteokalzin) [59, 111]. Im Vergleich zweier Mausstämme mit unterschiedlicher femoraler Bone Mineral Density (BMD), lassen die gewonnenen Daten schließen, dass die IGF-I Synthese ein möglicher Faktor für ungleichen Zugewinn oder Aufrechterhaltung der Knochenmasse der beiden Stämme ist [191]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IGF einerseits eine anabole Wirkung auf Knorpel und Knochen ausübt, andererseits aber Zellen der Osteoklastenlinie zur Resorption anregt.

In vivo Versuche mit IGF-I

Mehrere *in vivo* Versuche zeigen die Wirkungen von IGF-I auf die Knochenneubildung nach systemischer oder lokaler Applikation. So lässt sich nach systemischer Gabe von rekombinantem Wachstumshormon (rGH) die IGF-I Konzentration indirekt steigern und resultierend ein deutlicher Effekt auf die Distraktionsosteogenese und Knochendefektheilung erzielen[182]. Systemisch

appliziertes IGF-I verbessert die Heilung von Knochendefekten, das Längenwachstum des diaphysären Knochens und beschleunigt den Verschluss der Sutura frontalis bei Ratten [36, 243, 245]. Ferner findet sich eine Zunahme des Knochenvolumens und der Knochenbildungs-Aktivität. Als Marker hierfür fungieren eine gesteigerte Osteoblastenaktivität sowie ein ansteigendes Knochengewicht [223, 228]. Nach lokaler Applikation mittels osmotischer Infusionspumpen, Kathetern oder durch Polyorthoester-Membranen ist eine verbesserte Defektheilung und ein positiver Effekt auf das Knochenwachstum zu verzeichnen [95, 159, 242]. Zudem kann die Wirksamkeit von IGF-I auf den Knochenstoffwechsel in einer klinischen Patientenstudie bestätigt werden. Bei Kindern und Jugendlichen mit einer GH-Rezeptor-Defizienz (Laron Syndrom) wird das Längenwachstum durch die systemische Applikation des WF deutlich gesteigert [269].

1.3.5 Transforming growth factors

1.3.5.1 Einteilung

TGF-β1, auch Cartilage inducing factor A, gehört zu einer Gruppe verwandter Polypeptide, die TGF-β Superfamilie genannt wird [35]. Mittlerweile sind verschiedene Subtypen dieser Familie bekannt. Unter anderem TGF-β 1/2/3, die Subfamilie der BMPs und GDF 5 [136]. Alle Polypeptide der TGF-β Familie sind Homodimere mit einem mittleren Molekulargewicht von 25 kD und in ihrer Aminosäuresequenz zu 60-80 % homolog [225]. TGF-β1 selbst besitzt ein Molekulargewicht von 12,5 kD und 112 Aminosäuren pro Untereinheit [57]. Thrombozyten stellen die reichhaltigste natürliche Quelle mit 20 mg TGF-β1/kg dar [256]. Im Knochen findet sich 0,3 mg TGF-β1/kg [136, 220, 230].

TGF-β1 wird in der inflammatorischen Phase der Frakturheilung aus degranulierenden Thrombozyten des Hämatoms freigesetzt. Zusammen mit PDGF ist er der erste WF, der in der Frühphase nachweisbar ist [26, 63]. Des weiteren wird der WF von Makrophagen und anderen Entzündungszellen ausgeschüttet [66]. TGF-β1 wird in hohen Konzentrationen während Knochenentwicklung und Wachstum in Osteoblasten an der Knochenoberfläche sowie in der Knorpelmatrix exprimiert [58]. Dadurch werden Stoffwechselprozesse in Gang gesetzt und das erhöhte Leistungsniveau der Osteoblasten bezüglich Proliferation und Stoffwechselsanforderungen aufrechterhalten [98, 198, 199]. TGF-β wird von Osteoblasten und Osteoklasten in der Zone der Knochenneubildung gebildet und findet sich in Bereichen hypertrophierter Chondrozyten [98, 200]. Da TGF-β in Knochen- und Knorpelzellen selbst gebildet wird, fungiert der WF hier sowohl als autokriner als auch als parakriner Regulator [194]. Auf fast allen Zellen bindet TGF-β bereits in pikomolaren Konzentrationen mit hoher Affinität an deren Oberflächen-Rezeptoren [74, 137]. Verglichen mit anderen Körperzellen, weisen die Osteoblasten des Frakturspaltes an ihrer Oberfläche die größte Anzahl an TGF-β-Rezeptoren auf [18].

Tabelle 3: Transforming growth factor-β

Quelle	Wirkung auf die Zielzellen
Degranulierende Thrombozyten	Pleiotropiefaktor
Exrtrazelluläre Knochenmatrix	Proliferation von Osteoprogenitorzellen
Entzündungszellen Chondrozyten	Proliferation von undifferenzierten Mesenchymzellen und Chondrozyten
Osteoblasten	Bildung extrazellulärer Knochenmatrix

Modifiziert nach Barnes [18]

1.3.5.2 Steuerung TGF-ß1

Analog zur IGF-I-Expression wird auch die TGF-β1-Expression unter mechanischer Belastung gesteigert [178]. Ferner ist eine autoinduktive Wirkung von TGF-β bekannt.

Tabelle 4: Einfluss systemischer Hormone auf die TGF-β Synthese im Knochengewebe

Hormon	Wirkung
Dihydroxytestosteron	Anstieg der TGF-β mRNA
17β-Estradiol	Zunahme von Protein- und TGF-β-Synthese
17β-Estradiol + Parathormon	PTH hebt die Stimulation durch 17β-Estradiol auf
$1,25(OH)_2D_3$	Gesteigerte Bildung von TGF-β

[102, 164]

TGF-β wird in inaktiver Form, als latentes TGF-β, von Osteoblasten freigesetzt und in der mineralisierten Knochenmatrix gespeichert. Latentes TGF-β ist ein Komplex von hohem Molekulargewicht, der nicht an seine zellulären Rezeptoren binden oder von TGF-β-Antikörpern erkannt werden kann [146, 172]. Vor seiner funktionellen Aktivierung muss TGF-β aus diesem Komplex freigesetzt werden [43, 136]. *In vitro* kann TGF-β durch den Zusatz exogener Enzyme, wie Catepsin D oder Plasmin, durch extreme pH-Werte, bevorzugt im sauren Bereich oder durch Hitze aktiviert werden [132, 146, 260]. *In vivo* wird der latente Komplex durch ein proteolytisches, saures Milieu aktiviert, welches einerseits Makrophagen im Rahmen der Entzündungsreaktion und andererseits Osteoblasten bei Knochenneubildung und -Remodeling, erzeugen [201, 222]. Weiter spielen Aktivatoren und Inhibitoren des Plasmin-Protease-Systems eine wichtige Rolle [132]. Osteoblasten bilden Plasminogenaktivatoren und sind somit in der Lage, sowohl die Bildung als auch die Aktivierung von TGF-β zu vermitteln [125]. Da fast alle Zellen über TGF-β-Rezeptoren verfügen, ist anzunehmen, dass die Effekte von TGF-β über die Aktivierung des latenten Komplexes beeinflusst werden.

1.3.5.3 Biologische Wirkungen von TGF-ß

Transforming growth factors sind multifunktionale Zytokine mit einer weiten Bandbreite biologischer Wirkungen. Dazu gehören Steuerung von Wachstum, Zelldifferenzierung, -proliferation, Matrixsynthese und im Allgemeinen stimulierende Effekte auf Zellen mesenchymalen Ursprungs sowie hemmende auf Zellen ektodermalen Ursprungs [194].

TGF-β1 ist ein potenter Immunregulator mit zahlreichen Wirkungen auf die Zellen des Immunsystems [105, 186, 189]. In Monozyten stimuliert er die eigene Synthese sowie die anderer WF [259]. Zudem beeinflusst der Faktor über eine stimulierte Expression von Vascular endothelian growth factor (VEGF) in Osteoblasten die Vaskularisation des Knochens [196]. Das Ausmaß der Wirkungen von TGF-β auf die einzelne Zielzelle ist in großem Umfang von Parametern wie Zelltyp, Grad der Differenzierung, Anwesenheit anderer WF und seiner eigenen Konzentration abhängig. Niedrige Konzentrationen von TGF-β1 erhöhen die DNA-Synthese, wohingegen hohe Konzentrationen des WF die mitogene Aktivität reduzieren [45, 231].

Proliferation und Differenzierung

TGF-β1 ist aufgrund seiner Wirkungen auf mesenchymale Vorläuferzellen, Chondrozyten und Osteoblasten, ein Schlüsselregulator für Induktion, Heilung und Remodeling von mineralisiertem Gewebe [43, 199]. Der WF regt die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten an. Weiter stimuliert er die Proliferation und Teilung von Osteoblasten und osteoblastenähnlichen Zellen. Im weichen Kallus wird TGF-β1 von mesenchymalen Zellen und Chondrozyten gebildet, regt diese zur Proliferation an und stimuliert die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Zellen mit einem chondrozytären Phänotyp [44, 98].

Kollagen- und Matrixsynthese

TGF-β1 steigert die Synthese einiger Knochen- und Knorpelkomponenten, wie Kollagen Typ I, II, III, V, VI und X, Fibronektin, Osteopontin, Osteonektin, Thrombospondin, Proteoglykane und alkalischer Phosphatase [136, 193]. In vivo ist TGF-β1 der potenteste bekannte Induktor der Kollagenproduktion in Fibroblasten [136]. Während der Chondrogenese regt der Faktor die Knorpelmatrixsynthese durch Bildung von Kollagen II und Proteoglykanen an [220].

Verknüpfung von Knochenneubildung und Resorption

Proteasen und stimulierte Osteoklasten erzeugen durch Hydrolyse des Gewebes ein saures Milieu,

das TGF-β1 aus seinem latenten Komplex freisetzt und aktiviert [27]. Der aktivierte WF regt die chemotaktische Einwanderung von Osteoblasten in die Resorptionszone an und hält die Matrixsynthese in den umgebenden Knochenzellen mittels auto- und parakriner Stimulation aufrecht [117, 148, 187]. Diese wichtige Verbindung von Knochenresorption und lokaler Stimulation der Matrixneubildung unterstreicht die Bedeutung von TGF-β1 im Metabolismus des Knochens [199].

In vivo Versuche mit TGF-β1

Durch systemische Applikation von TGF-β1 können Neubildung und Proliferation von Osteoblasten sowie Knochenmatrixsynthese und -Remodeling bei Knochendefekten gesteigert werden [22]. Zudem ist eine gesteigerte Knochenneubildung mit generalisierter Osteoblastenhypertrophie und erhöhter Synthese an Matrix-Proteinen zu beobachten [185, 240].

Durch die lokale Applikation des WF mittels osmotischer Minipumpen oder lokaler Injektionen ist eine deutlich zunehmende Knochen- und Kallusbildung, erhöhte mechanische Stabilität sowie eine stimulierte Fraktur- und Defektheilung zu beobachten [22, 53, 97, 123, 155, 160, 197]. In Implantatbeschichtungen aus HA (Hydroxylapatit) eingearbeitetes TGF-β1 führt zu einer verstärkten Einsprossung von Knochengewebe [122].

1.3.6 Kombination von IGF-I und TGF-ß1

IGF-I und TGF-β1 zeigen viele gemeinsame, synergistische Effekte auf den Knochenstoffwechsel [168]. Die kombinierte Applikation verfügt über einen größeren stimulierenden Effekt auf die Zunahme der Knochenmatrix als die jeweilige Einzelapplikation [120, 168]. Interaktionen zwischen IGF-I und TGF-β1 beeinflussen die Freisetzung und Organisation der Knochenmatrix und des Knorpels [250]. Beide stimulieren die Proliferation von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten während der Frakturheilung [148].

TGF-β1 induziert in osteoblastären Zelllinien die Bildung von IGF-I [248]. Der Einfluss von TGF-β1 auf die IGF-I Synthese des Knochengewebes wird jedoch kontrovers diskutiert, da in unterschiedlichen Zellmedien sowohl stimulierende, als auch hemmende Effekte beschrieben werden [67, 124, 248].

Tabelle 5: Gemeinsame in vitro Effekte von IGF-I und TGF-β1 auf Osteoblasten

	Proliferation	Differenzierung	Chemotaxis	Kollagen-synthese	Synthese nicht-kollagener Proteine	Alkalische Phosphatase
TGF-β1	+ + +	+ + +	+ + +	+ +	+ / –	– / +
IGF-I	+	+	+	+	0	0

Modifiziert nach Lind [120]

Diese und weitere Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass beide Faktoren im Knochengewebe im Hinblick auf ihre Konzentration und Funktion aneinander gekoppelt sind. Es ist also anzunehmen, dass sich der therapeutische Effekt steigern lässt, wenn WF in Kombination verabreicht werden [25, 120, 168].

1.3.7 Bone morphogenetic proteins

Zahlreiche Studien belegen einen deutlichen osteoinduktiven und chondroinduktiven Effekt dieser Wachstumsfaktorengruppe [271]. Nach der Entdeckung von Urist 1965, dass devitialisierter Knochen eine ektope Knochenbildung im Muskelgewebe hervorrufen kann [254], dauerte es 23 Jahre, bis man die entsprechenden Proteine (BMPs) isolieren und klonen konnte [271].

1.3.7.1 Einteilung

Bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören zur Gruppe der TGF-β Superfamilie. Derzeit sind mehr als 15 verschiedene Proteine in der BMP Subfamilie identifiziert [42, 273]. Diese lassen sich wiederum in verschiedene Untergruppen, je nach Struktur und Funktion unterteilen. BMP-2 und BMP-4 zeigen einen vergleichbaren strukturellen Aufbau und bilden die BMP-2/4 Gruppe. BMP-5, BMP-6, BMP-7 (Osteogenic protein 1 / OP-1) und BMP-8 (OP-2) können zu einer weiteren Subgruppe zusammengefasst werden (OP-1 Gruppe). Growth-differentiation factor-5 (cartilage-derived morphogenetic protein-1/ GDF-5), GDF-6 (BMP-13) und GDF-7 (BMP-12) gehören zur GDF-5 Gruppe. Die BMP-2/4 Gruppe und die OP-Gruppe führt zu einer Induktion von Knochen- und Knorpelgewebe *in vivo*, während die GDF-5 Gruppe die Bildung von Knorpel und Sehnengewebe fördert. Weitere BMPs, wie das Myostatin (GDF-8), sind nicht in der Lage Knochen- oder Knorpelgewebe zu induzieren, spielen jedoch eine zentrale Rolle bei der Muskelformation [104].

1.3.7.2 BMP Rezeptoren und Signaltransduktion

Mitglieder der TGF-β Superfamilie binden hauptsächlich an Typ-I und Typ-II Serin-Threoninkinase-Rezeptoren [87]. Beide Rezeptoren sind essentiell für die intrazelluläre Signaltransduktion. Die BMPs und ihre aktiven Liganden können unabhängig an Typ-II-Rezeptoren binden, während die Bindung an Typ-I-Rezeptoren nur in Anwesenheit der Typ-II-Rezeptoren möglich ist.

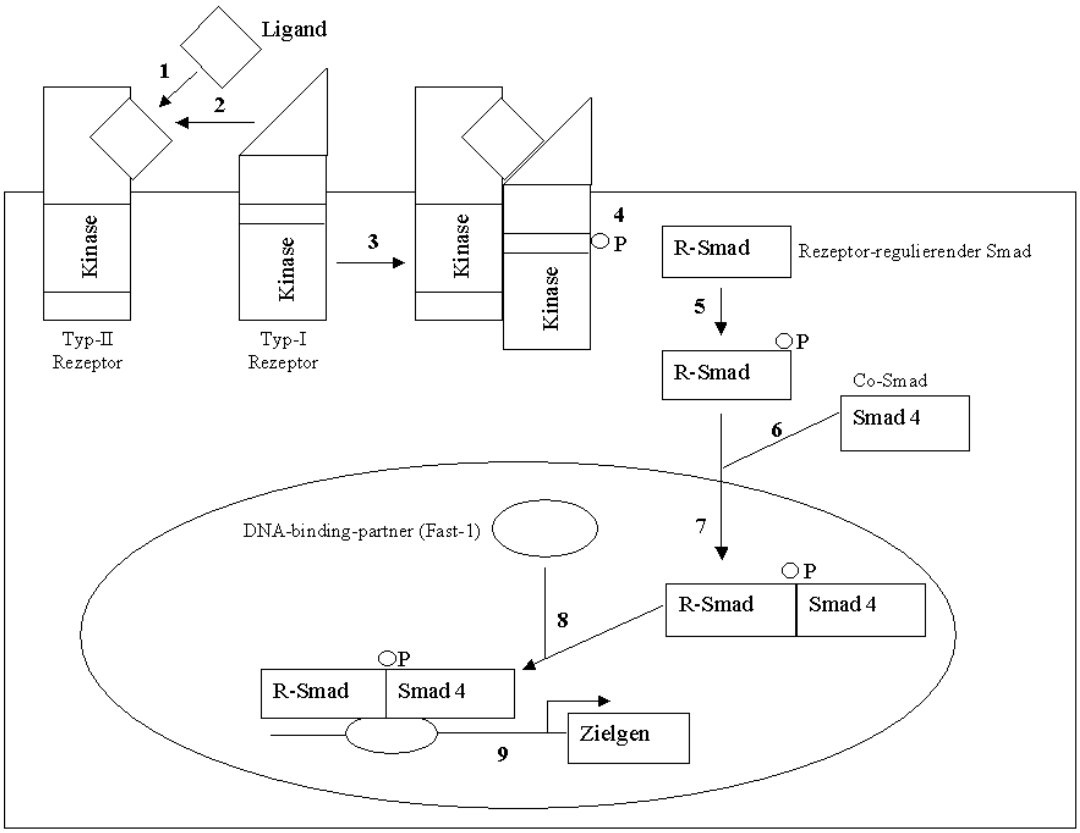

Abb. 3: Schematische Darstellung der BMP-Signaltransduktion

Die Bindung von BMP-2 an seinen Typ-II-Rezeptor (1) führt zusammen mit dem Typ-I-Rezeptor (2) zu einem Rezeptorkomplex (3) und zu einer Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors (4). Nach dieser Aktivierung kommt es zur Phosporylierung eines Rezeptor-regulierenden-Smads (R-Smad) (5), der mit Smad 4 (6) gekoppelt zum Nukleus gelangt (7). Im Nukleus bindet dieser Smad-Protein-Komplex mit einem DNA-binding-partner (8). Dieser Komplex koppelt an das spezifische Enhancer-Ziel-Gen (9) und aktiviert die Transkription der Zielgene [135].

1.3.7.3 Biologische Wirkungen von BMPs

BMP-2 und BMP-7 sind die am besten untersuchten Wachstumsfaktoren. Beide zeigen eine deutliche osteoinduktive Wirkung. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass BMP-2 in der Lage ist ektope Knochenbildung in verschiedensten Geweben zu induzieren [162, 262, 275]. Beide Wachstumsfaktoren sind weit verbreitet und erfüllen zahlreiche Funktionen bei der Proliferation und Differenzierung unterschiedlichster Gewebe [121, 272].

In vivo Studien haben gezeigt, dass BMP-2, freigesetzt aus Kollagenschwämmen die Frakturheilung beschleunigt [32, 264]. Ein dosis-abhängiger Effekt auf die Knochendefektheilung konnte bei der lokalen Freisetzung von BMP-2 aus porösen Polylaktid-Blöcken am Kaninchen beobachtet werden [277]. Ferner zeigten sich deutliche Effekte von lokal appliziertem BMP-2 auf die Knochendefektheilung an Ratten [273], Schafen [106] und Hunden [219, 255] sowie eine induzierte Heilung von Knochendefekten der Mandibula beim Hund [247] und bei Affen [33]. In der experimentellen Wirbelsäulenfusion stellt derzeit der Wachstumsfaktor BMP-2 aufgrund seiner hohen osteoinduktiven Kapazität den „golden standard“ dar. Der Effekt von BMP-2 konnte in verschiedenen Tiermodellen bei der spinalen Fusion demonstriert werden [151, 204]. Kombiniert mit Kollagen-Trägersystem wurden BMP-2 und BMP-7 in klinischen Studien bei Unterschenkelfrakturen [83] und im Bereich der Wirbelsäulenfusion [131] untersucht und sind bis dato die einzigen Wachstumsfaktoren, die für die klinische Anwendung am Stütz und Bewegungsapparat zugelassen sind.

1.4 Möglichkeiten der Applikation von Wachstumsfaktoren

In der Literatur werden zahlreiche Wege diskutiert, wie die Frakturheilung mit Hilfe von WF, wie IGF-I, TGF-β1 oder BMP-2, positiv beeinflusst werden kann. Eine große Herausforderung bei der Forschung auf diesem Gebiet besteht zudem darin, geeignete Applikationsformen zu entwickeln, die eine optimale Wirkung der Faktoren gewährleisten und das Risiko von Nebenwirkungen minimieren. In bisherigen Versuchen werden die Faktoren entweder systemisch, durch Injektionen und Katheter oder lokal, mittels osmotischer Minipumpen und subperiostaler Injektionen, verabreicht [95, 97, 123, 159, 160, 183]. Eine weitere Möglichkeit der lokalen Applikation besteht in der Einarbeitung der WF in Trägermaterialien, wie Kollagenschwämme, Gele und Membranen, die operativ direkt an den Wirkort gebracht werden [22, 36, 264]. Obwohl hier Effekte der Faktoren auf Knochengewebe und -stoffwechsel nachweisbar sind, erscheinen diese Methoden für die klinische Anwendung unpraktikabel.

Bei der lokalen Injektion von TGF-β ist im Bereich der Einstichstelle eine ausgeprägte Ödembildung zu beobachten [54]. Mit jeder Injektion wird zudem ein Minitrauma erzeugt, das den Heilungsprozess stören und eine Eintrittspforte für Keime darstellen kann. Auch externe Pumpen, Katheter oder direkt vor Ort platzierte Trägermaterialien bergen die Gefahr von Infektionen. Letztere können durch sekundäre Dislokationen zusätzliche Folgeeingriffe erforderlich machen. Kollagenschwämme bestehen teilweise aus bovinem Material, das im Körper als Fremdeiweiß zu allergischen Reaktionen führen kann [238]. Zudem ist die biologische Halbwertzeit der WF nach systemischer Applikation verhältnismäßig kurz [125]. Des weiteren können konzentrationsabhängig unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Bei systemisch appliziertem IGF-I können neben Elektrolytverschiebungen auch Veränderungen der Serumkonzentrationen von Insulin und Wachstumshormon auftreten. Weiter sind Hypoglykämie, Hypokaliämie, Konvulsionen, Pseudotumor cerebri, Papillenödem, Facialisparesen, Parotisschwellung, Tachycardie, veränderte Leberwerte, Anti-IGF-I-Antikörper, Haarausfall und vermehrt Infektionen des oberen Respirationstraktes beschrieben [258, 269]. Zudem beeinflusst IGF-I die Nierenfunktion und ist bei experimentell erzeugtem Diabetes in erhöhten Konzentrationen zu finden [73]. Die Möglichkeit, TGF-β1 systemisch zu verabreichen, ist aufgrund dessen immunsupressiver Wirkungen stark eingeschränkt [125]. Die hochdosierte, systemische Applikation von rh-TGF-β1 erzeugt bei Ratten ein Spektrum an Läsionen in zahlreichen Zielgeweben des Organismus sowie im Bereich der Injektionsstellen an Venen und Muskelgewebe [240].

Auch für BMPs sind verschiedene Applikationsformen für die lokale Freisetzung beschrieben: (1) Freisetzung von BMP-2 kodierender DNA [17], (2) ex vivo Gentherapie [118, 251] und (3) die lokale Applikation des Proteins aus verschiedenen Trägermaterialien [19]. Diese Applikationsformen erfordern jedoch die Eröffnung der Fraktur oder des Knochendefektes, um das Trägermaterial am Wirkort zu platzieren. Ein nicht korrekt platzierter Träger kann zu einer unkontrollierten Freisetzung von BMP-2 in umliegendes Gewebe (Nerven, Muskel, Gefäße) mit ektoper Knochenbildung führen.

1.4.1 Anforderungen an lokale Applikationssysteme

Da die systemische Applikation der Wachstumsfaktoren zahlreiche Probleme mit sich bringt, erscheint es sinnvoll, die Entwicklung geeigneter lokaler Applikationssysteme voranzutreiben, die keine zusätzlichen Fremdkörper in den Organismus einbringen.

Diese Applikationssysteme sollten die Wirkung der Faktoren optimal gewährleisten sowie deren ausreichende biologische Aktivität für optimale Effekte sicherstellen. Sie müssten bioresorbierbar sein und durch Knochen ersetzt werden [62]. Um Immunreaktionen, Toxizität und Nebenwirkungen zu reduzieren, ist die Biokompatibilität eine weitere Anforderung an das Trägermaterial. Die Knochenbildung darf weder durch eine hervorgerufene Entzündungsreaktion, noch durch physikalische Blockierung aufgrund unvollständigen Abbaus beeinträchtigt werden. Weiter müsste das Trägermaterial zu sterilisieren sein sowie eine flexible Dosierung der WF ermöglichen. Hierbei ist erforderlich, dass die Faktoren kontinuierlich und kontrolliert freigesetzt werden, da sie ansonsten resorbiert würden, ehe sie ihre Wirkungen entfalten könnten. Eine hohe Benutzerfreundlichkeit und leichte Handhabung für den Operateur sind anzustreben [116]. Zudem sollte die Applikation der Wirkstoffe auch bei geschlossenen Frakturen möglich sein.

1.4.2 Mit Wachstumsfaktoren beschichtete Implantate

Idealerweise könnte die Freisetzung bioaktiver Substanzen aus einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung von Osteosynthesematerialien erfolgen. Diese Beschichtung muss fest auf der Oberfläche des Implantats haften. Beschichtete Osteosynthesematerialien stabilisieren zum einen die Fraktur und dienen zudem als „Drugcarrier“ für die lokale, kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen[188]. TGF-β1, IGF-I und BMP-2 üben optimale Effekte auf die Knochenheilung bereits bei sehr niedrigen Wirkspiegeln aus, deshalb können sie für die lokale Applikation in Implantatbeschichtungen eingearbeitet werden [22, 236]. Die in die Beschichtung eingearbeitete Menge und die Freisetzung der Faktoren kann, bezogen auf den Gesamtorganismus, gering gehalten werden. So werden hohe Konzentrationen, bei geringer systemischer Belastung, direkt an ihren Wirkort gebracht. Das Prinzip der indirekten Stabilisierung der Fraktur durch das Implantat kann aufrecht erhalten werden und die Fraktur muss nicht eröffnet werden, um die Wirksubstanzen zu platzieren [206].

1.4.3 Biodegradierbare Trägermaterialien

Für die Beschichtung von Osteosyntheseimplantaten mit WF sind verschiedene biodegradierbare Materialien als Trägersubstanzen Gegenstand der Forschung: Organische Stoffe, Keramiken und synthetische Polymere [127, 170, 217, 225]. Einige dieser Materialien erfüllen oben genannte Kriterien nicht ausreichend. Respektive können Rückstände des Trägermaterials [217] nachgewiesen werden, die eine chronische Entzündungsreaktion erzeugen und die Osteoinduktion hemmen [171, 225]. Teilweise ist die Biodegradierung auch beendet, ehe der WF biologische Effekte erzielt [119].

Biomaterialien auf der Basis von Polylaktiden, Polyglykolsäuren und ihrer Co-Polymere, ermöglichen eine genaue Dosierung und Kombination der Faktoren sowie deren gleichzeitige oder zeitlich versetzte Freisetzung [2, 3, 81, 244].

1.4.3.1 Poly(D,L-Laktid) (PDLLA)

Bereits 1960 wurde Polylaktid (PLA) als biodegradierbares Material für chirurgische Implantate entwickelt. Das Trägermaterial Poly(D,L-Laktid) (PDLLA) ist ein inertes, amorphes PLA-Stereo-Co-Polymer, das durch Hydrolyse zu Laktidsäure biodegradiert und letztlich als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden wird. Nach der Metabolisierung können weder in Faeces noch im Urin toxische Metabolite des Laktids nachgewiesen werden [109, 110]. *In vitro* behält PDLLA im Verlauf von bis zu 25 Wochen nahezu 100 % seiner Stabilität und kann, abhängig von der Menge, *in vivo* innerhalb eines Jahres vollständig degradiert werden. Im umliegenden Gewebe einiger Biomaterialien auf der Basis von Polymeren bildet sich ein Resorptionssaum und finden sich vermehrt Makrophagen [165]. Dies konnte jedoch in anderen Studien nicht bestätigt werden [144, 169, 188, 232, 263]. PDLLA reduziert darüber hinaus die Adhäsion von Mikroorganismen auf der Implantatoberfläche [213].

1.5 Wissenschaftliche Fragestellungen

Wachstumsfaktoren sind wichtige Steuerelemente des Knochenzellmetabolismus. *In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass einige dieser Faktoren wie Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) und Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen [125, 155, 159] und somit die Knochenheilung stimulieren [10, 273]. Der genaue Wirkmechanismus dieses positiven Effektes der Wachstumsfaktoren und ihre Interaktion im Verlauf der Frakturheilung ist nicht bekannt.

Die lokale Applikation der Faktoren für einen therapeutischen Einsatz bei der Frakturheilung stellt jedoch ein Problem dar. Die kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren Beschichtung von Implantaten könnte die Frakturheilung lokal stimulieren. Das beschichtete Osteosynthesematerial würde einerseits die Fraktur stabilisieren und gleichzeitig als „Carrier“ für die lokale Freisetzung von Wirksubstanzen dienen.

Daraus ergaben sich folgende wissenschaftliche Fragestellungen, die in experimentellen Studien untersucht wurden:

1. Entwicklung eines geeigneten Applikationssystems für die lokale und kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren von beschichteten osteosynthetischen Implantaten
2. Etablierung standardisierter Modelle zur Untersuchung des Effektes lokal applizierter Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung
3. Untersuchung des Effektes lokal applizierter Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung im Kleintier- und Großtiermodell
4. Untersuchung möglicher lokaler und systemischer unerwünschter Wirkungen sowie des Langzeiteffektes lokal freigesetzter Wachstumsfaktoren
5. Vergleich lokaler mit systemischen Stimulationsmöglichkeiten der Frakturheilung
6. Untersuchung der Rolle und Interaktion von Wachstumsfaktoren vor allem in der Frühphase der Frakturheilung

2 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

2.1 Entwicklung einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung für Biomaterialien zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren

Wie bereits unter 1.4. erläutert, werden in der Literatur zahlreiche Wege diskutiert, wie die Frakturheilung mit Hilfe von Wachstumsfaktoren, wie IGF-I, TGF-β1 oder BMPs, positiv beeinflusst werden kann. Die bisherigen Applikationsformen erscheinen jedoch für den klinischen Einsatz unpraktikabel oder mit einem erhöhten Risiko für systemische und lokale Nebenwirkungen verbunden zu sein.

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines geeigneten Applikationssystems für die lokale und kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren von beschichteten osteosynthetischen Implantaten. Die Eigenschaften der biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid) Beschichtung, deren mechanische Stabilität, das Abbauverhalten des Trägermaterials, die Stabilität der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren sowie deren Freisetzungskinetik wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht [213].

Link zur Publikation:

Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors.

2.2 Entwicklung eines Frakturmodells an der Ratte

Verschiedene Modelle zur Untersuchung der Frakturheilung sind in der Literatur beschrieben [5, 14, 28, 46, 77, 163, 176].

Die verwendeten Modelle sind jedoch nicht einheitlich. Das bekannteste und am häufigsten verwendete Modell wurde von Bonnarens und Einhorn beschrieben [28]. Alle beschriebenen Modelle stabilisierten den zu untersuchenden Knochen vor der Fraktur oder verwendeten unstandardisierte manuelle Frakturvorrichtungen [15].

Ziel war es daher, ein geschlossenes Frakturmodell zu entwickeln, das der klinischen Situation möglichst nahe kommt und standardisiert reproduzierbar durchgeführt werden kann.

Analog der Versorgung von Schaftfrakturen in der Klinik erfolgt die Reposition und intramedulläre Stabilisation nach Frakturerzeugung. Der dabei entstandene Weichteilschaden wurde gemessen, biomechanische Untersuchungen und histomorphometrische Analysen 28, 42 und 84 Tagen nach Fraktur durchgeführt. Die gewonnenen Daten dienten als Grundlage, um den Einfluss von stimulierenden Substanzen auf die Heilungsvorgänge im zeitlichen Verlauf zu erfassen [92, 206, 216].

2.3 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1 auf die Frakturheilung der Ratte

Ziel dieser Studien war es, den Effekt von IGF-I und TGF-β1 auf die Frakturheilung durch Einzelapplikation im Vergleich zur kombinierten Gabe beider Faktoren anhand radiologischer, biomechanischer und histomorphometrischer Analysen *in vivo* zu untersuchen.

Die Applikation erfolgte lokal durch Poly(D,L-Laktid) beschichtete Titan-Kirschnerdrähte (siehe 2.1) unter Verwendung des unter 2.2 beschriebenen Frakturmodells [92, 211].

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen erfolgten Untersuchungen über den Effekt der kombinierten Wachstumsfaktorengabe auf die Frakturheilung unter besonderer Berücksichtigung lokaler und systemischer Nebenwirkungen. Ferner sollte der Effekt der PDLLA-Beschichtung auf den Knochenmetabolismus untersucht werden.

Es folgten radiologische Verlaufsuntersuchungen und die Analyse von Serumparametern. Das Körpergewicht und die Körpertemperatur wurden gemessen, um systemische unerwünschte Wirkungen zu erfassen. Nach 28 und 42 Tagen wurden die Knochen biomechanisch torsional getestet sowie histologisch und histomorphometrisch untersucht [206].

Diese Arbeiten haben gezeigt, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren die frühe Phase der Frakturheilung stimuliert. Unklar blieb jedoch ein möglicher Langzeiteffekt lokal freigesetzter Wachstumsfaktoren auf den Knochenstoffwechsel.

Ziel einer weiteren Studie war es daher, den zeitlichen Verlauf der regulären Frakturheilung im Vergleich zur mit IGF-I und TGF-β1 stimulierten Frakturheilung an dem unter 2.2 beschriebenen Frakturmodell zu untersuchen. Der Verlauf der Frakturheilung wurde 28, 42 und 84 Tagen nach Fraktur untersucht [212, 216].

Link zur Publikation:

Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-ß1) from a biodegradable poly(d,l-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats

2.4 Untersuchung der lokalen Applikation von BMP-2 auf die Frakturheilung der Ratte

Zahlreiche Studien belegen einen deutlichen osteoinduktiven und chondroinduktiven Effekt von BMP-2 (siehe 1.3.7).

Gerade bei der lokalen Anwendung von BMPs erscheint die kontrollierte lokale Freisetzung aus Poly(D,L-Laktid)-beschichteten Implantaten sinnvoll.

In der folgenden Studie wurden Kirschnerdrähte mit dem unter 2.1 beschriebenen Verfahren unter Einarbeitung von rekombinantem humanen BMP-2 beschichtet. Die Frakturheilung wurde 28 und 42 Tagen nach Fraktur mit dem unter 2.2 beschriebenen Frakturmodell an der Ratte untersucht und mit den Ergebnissen der lokalen Freisetzung von IGF-I und TGF-β1 verglichen [207].

Link zur Publikation:

Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats.

2.5 Der Einfluss der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1auf die Osteotomieheilung im Schweinemodell

Die Vorarbeiten zeigten, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten signifikant die Frakturheilung im Rattenmodell beschleunigt. Zur Vorbereitung einer humanen Anwendung sollte dieser Effekt erstmals an einem Großtiermodel untersucht werden. Ferner sollten mögliche lokale und systemische Effekte durch die Wachstumsfaktoren erfasst werden.

Hierzu wurde eine Osteotomie des Tibiaschaftes von Yukatan-Minischweinen mit beschichteten verus unbeschichteten Titan-Tibianägeln intramedullär stabilisiert. Es folgten Röntgenuntersuchungen im Verlauf, Analyse der Blutparameter (einschließlich IGF-I und der IGF-Bindungsproteine), Körpergewicht und Temperatur wurden gemessen sowie Anzeichen für lokale oder systemische unerwünschte Reaktion erfasst. Nach 28 Tagen wurden beide Tibiae entnommen, biomechanisch getestet und histomorphometrisch analysiert [181].

Link zur Publikation:

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.

2.6 Effekt der systemischen Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur lokalen Wachstumsfaktorengabe

Neben der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren zeigte die systemische Gabe von Wachstumshormon eine deutliche Beschleunigung der Regeneratheilung bei der Distraktionsosteogenese sowie bei der Knochendefektheilung (siehe 1.2).

Ziel dieser Studie war es daher, die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren mit der systemischen Gabe von rekombinantem spezies-spezifischem Wachstumshormon im Rattenmodell zu vergleichen. Anhand radiologischer, biomechanischer und histomorphometrischer Untersuchungen 28 Tage nach Fraktur sollte die Frage untersucht werden, ob sich durch die Kombination lokaler und systemischer Stimulationstechniken eine weitere Beschleunigung der Frakturheilung erzielen lässt [215].

Link zur Publikation:

Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1.

2.7 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Osteoblastenaktivität und Kollagenproduktion in vitro

Die Vorarbeiten zeigten eindeutig einen stimulierenden Effekt der lokal applizierten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 auf die Fraktur- und Defektheilung im Ratten- und Schweinemodell. Darüber hinaus konnte ein stimulierender Effekt des Trägermaterials PDLLA auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden. Unklar ist jedoch weiterhin der genaue Wirkmechanismus der einzelnen WF und deren Interaktion auf zellulärer Ebene.

Das Ziel dieser Studie war daher die Untersuchung des Einflusses der WF und des PDLLA auf eine humane Osteoblasten-Zelllinie. Die beschichteten versus unbeschichteten Titan-Implantate und Zellen wurden durch Tissue-Culture-Membranen getrennt kultiviert. Die Zellen wurden für 10 Tage inkubiert und die beschichteten versus unbeschichteten Implantate (n = 6 pro Gruppe) für 1h, 12h, 24h, 2d, 4d, oder 10 Tage hinzugegeben. Um den Effekt der WF oder der PDLLA-Beschichtung zu analysieren, wurden die Zellen auf Proliferation, Metabolismus und Differenzierung untersucht. Als indirekter Marker für die Differenzierung diente die Kollagen I Produktion [210].

Link zur Publikation:

IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture.

2.8 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Differenzierung in vivo

Unter dem Einfluss von IGF-I und TGF-β1 zeigten Osteoblasten einen signifikanten Anstieg der Kollagen I Produktion mit einem Abfall der proliferativen und metabolischen Aktivität *in vitro* [210].

Um die Rolle und Interaktion der Wachstumsfaktoren während der Frühphase der Frakturheilung *in vivo* zu untersuchen, wurden zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung 5, 10 und 15 Tage nach Fraktur in dem unter 2.2 beschriebenen Frakturmodell analysiert.

Zwei verschiedene immunhistochemische Marker dienten der Untersuchung der Zellproliferation: *in vivo* Injektion des Thymidin-Analogs BrdU sowie Antikörper gegen PCNA [268].

Link zur Publikation:

Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU.

2.9 Osteogenese und Vaskularisation im Verlauf der Frakturheilung bei lokaler Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1

In dieser Studie wurde der Effekt der entwickelten PDLLA-Beschichtung und der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 auf Osteogenese und Vaskularisation - essentielle Faktoren für eine erfolgreiche Knochenheilung - im Verlauf der Frakturheilung untersucht. Sprague-Dawley Ratten wurden unter standardisierten Bedingungen die rechte Tibia frakturiert und intramedullär stabilisiert. Nach 5, 10, 15 und 28 Tagen wurden die Knochen entnommen und für die Immunhistologie aufbereitet. Osteogenese und Vaskularisation im Verlauf der Frakturheilung wurden mit Hilfe der Antikörper gegen E11 und α-smooth muscle actin untersucht [233, 234].

2.10 Quantifizierung, Lokalisation und Expression von Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung

IGF-I und TGF-β1 sind zwei der häufigsten WF des Knochens [20]. Obwohl beiden Faktoren, aufgrund ihrer Wirkungen als Regulatoren des Knochenstoffwechsels [27, 44, 56, 190], bei der enchondralen Ossifikation [29, 41] und bei der Zunahme des Knochengewebes während Wachstum [93, 138, 252] und Knochenheilung [123, 241] große Aufmerksamkeit geschenkt wird, sind die Kenntnisse bezüglich ihrer Konzentrationen während der Frakturheilung noch unzureichend.

Ziel dieser Studie war die Etablierung einer geeigneten Gewebeaufarbeitung, die eine Quantifizierung der WF, IGF-I und TGF-β1 im Frakturkallus mittels ELISA Untersuchungen ermöglichte. Erstmals sollten frakturassoziierte Konzentrationsschwankungen von IGF-I und TGF-β1 während der Frühphase der Frakturheilung 5, 10 und 15 Tage nach Fraktur, quantifiziert und der Effekt, der lokal applizierten Wachstumsfaktoren auf die Gesamtkonzentration untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde in dem unter 2.2 beschriebenen Rattenmodell eine Fraktur der rechten Tibia und Fibula erzeugt und diese intramedullär mit beschichteten versus unbeschichteten Titan-Kirschnerdrähten stabilisiert. Als Referenzgruppe dienten unfrakturierte Tibiae [266, 267].

3 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung für Biomaterialien zur lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren

Um die Frakturheilung mit Hilfe von Wachstumsfaktoren positiv zu beeinflussen, müssen geeignete Applikationsformen entwickelt werden, die eine optimale Wirkung der Faktoren gewährleisten und das Risiko von Nebenwirkungen minimieren. In bisherigen Ansätzen werden die Faktoren entweder systemisch oder lokal, mittels Pumpen, Injektionen oder durch Einarbeitung der WF in Trägermaterialien verabreicht [22, 36, 95, 123, 159, 160, 183]. Obwohl hier Effekte der Faktoren auf Knochengewebe und -stoffwechsel nachweisbar sind, erscheinen diese Methoden für die klinische Anwendung unpraktikabel.

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines geeigneten Applikationssystems auf der Basis von Poly(D,L-Laktid) für die lokale und kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren von beschichteten osteosynthetischen Implantaten.

Die Beschichtung kann in einem kalten Verfahren durchgeführt werden, wodurch die Einarbeitung von biologisch aktiven Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, möglich ist. Mikrobiologische Untersuchungen zeigten, dass die Beschichtung unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden kann. Titanimplantate weisen auf Grund ihrer Oberflächenstruktur eine bessere Haftung der Polylaktid-Beschichtung im Vergleich zu Stahlimplantaten auf. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben eine Schichtdicke von 10 – 14 µm mit einer gleichmäßigen Beschichtungsoberfläche.

Die mechanische Stabilität der Beschichtung ist eine wichtige Vorraussetzung für den Einsatz dieser Technologie in der orthopädischen und unfallchirurgischen Chirurgie. Ein unkontrollierter Abrieb könnte zu einer Freisetzung eingearbeiteter Wachstumsfaktoren außerhalb der Frakturzone mit konsekutiv unerwünschten Wirkungen führen. Unter extremen mechanischen Belastungen während einer intramedullären Insertion mit anschließender Extraktion zeigte sich ein maximaler Abrieb der Beschichtung von unter 3 %, gleichmäßig über das ganze Implantat verteilt. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten dabei keinen Verlust der Beschichtung bis auf die Metalloberfläche.

Das Abbauverhalten des Trägermaterials PDLLA ist von entscheidender Bedeutung für die Verwendung als Wirkstoffträger. Ein unkontrollierter, schneller Abbau der Beschichtung könnte einerseits zur unkontrollierten Freisetzung der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren führen, andererseits zu lokalen Fremdkörperreaktionen durch vermehrt auftretende Abbauprodukte des Polymers. Das verwendete Poly(D,L-Laktid) wird durch chemische, thermische, mechanische und physikalische Mechanismen abgebaut [82]. Die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zeigten

einen Abbau des PDLLA von ca. 7 % innerhalb von 6 Wochen und 10 % nach 9 Wochen im Elutionsversuch. *In vivo* fand sich ein vergleichbarer kontinuierlicher Abbau. Die freigesetzten Metabolite werden vollständig im Zitratzyklus verstoffwechselt [108, 109].

Die eingearbeiteten Substanzen können durch Diffusion, Schwellung und Erosion des Polymers freigesetzt werden [34]. Die Ergebnisse der Freisetzungskinetik zeigten, dass die WF hauptsächlich durch Diffusion, ohne relevanten Masseverlust der PDLLA-Beschichtung innerhalb von 42 Tagen kontrolliert freigesetzt werden. 54 % IGF-I und 48 % TGF-β1 wurden innerhalb von 48 Stunden freigesetzt. Die weitere Freisetzung von ca. 30 % erfolgte konstant bis zum 42. Tag. Die eingearbeiteten WF behielten dabei ihre biologische Aktivität in der Beschichtungsmasse für einen Zeitraum von mindestens einem Jahr.

Kombiniert mit Kollagen-Trägersystem wurden WF (BMP-2 und BMP-7) in klinischen Studien bei Unterschenkelfrakturen [83] und im Bereich der Wirbelsäulenfusion [131] untersucht. Das entwickelte Applikationsverfahren zeigt sich gegenüber der lokalen Freisetzung aus Kollagenschwämmen vorteilhaft. Kollagenschwämme bestehen meist aus bovinem Material, dass zu allergischen Reaktionen führen kann [238]. Darüber hinaus kann eine Übertragung von Prionen (BSE) nicht sicher ausgeschlossen werden. Ferner zeigen Kollagenschwämme eine nicht kontinuierliche Freisetzung eingearbeiteter Wirksubstanzen [226]. Diese Träger müssen direkt am gewünschten Wirkort platziert werden. Bei unkorrekter Platzierung oder Dislokation des Trägers können unerwünschte Reaktionen durch die freigesetzten Wirksubstanzen im Weichteilgewebe hervorgerufen werden. Durch die Beschichtung von intramedullären Kraftträgern mit PDLLA muss die Fraktur nicht zusätzlich eröffnet werden, um die Wirksubstanzen am gewünschten Wirkort zu applizieren.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten die Vorraussetzung erfüllt, für die lokale Stimulation der Frakturheilung eingesetzt zu werden. Die experimentellen Studien zur Untersuchung des Effektes der lokal freigesetzten WF auf die Frakturheilung wurden daher unter Verwendung dieser Technologie durchgeführt [213].

3.2 Entwicklung eines Frakturmodells an der Ratte

Ratten werden häufig bei Studien über den Knochenstoffwechsel und die Frakturheilung eingesetzt. Es existieren demnach eine Vielzahl von Daten über die normale und pathologische Frakturheilung. Sie gelten als die weltweit am häufigsten verwendeten Versuchstiere bei Untersuchungen des Einflusses von Wachstumshormon und Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung [6, 15, 241]. Die Wirksamkeit von rekombinantem humanem Wachstumshormon und rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren bei Ratten wurde mehrfach beschrieben [13].

Das Knochenwachstum von Ratten ist mit dem 5. Lebensmonat abgeschlossen, dennoch nimmt das Körpergewicht der Laborratten über die gesamte Lebenszeit kontinuierlich zu. Die Stadien der Knochenheilung bei der Ratte sind mit der sekundären Knochenheilung des Menschen vergleichbar, wenn auch die relative Knorpelmenge bei der Frakturheilung der Ratte höher ist als bei größeren Wirbeltieren [8, 89, 175].

Verschiedene Modelle zur Untersuchung der Frakturheilung sind in der Literatur beschrieben [5, 14, 28, 46, 77, 163, 176]. Diese sind jedoch nicht einheitlich. Tibia oder Femur der Ratten werden osteotomiert [77], manuell gebrochen [253] oder mit Hilfe verschiedener Vorrichtungen nach intramedullärer Stabilisierung frakturiert [28]. Zusätzlich wurden verschiedene Stabilisationstechniken untersucht [9, 14, 28, 50, 115, 181]. Einige Modelle erfordern hierbei ein offenes Vorgehen mit einem nicht unerheblichen Weichteiltrauma. Es ist hinreichend bekannt, dass das Weichteiltrauma einen großen Einfluss auf die Frakturheilung hat [88]. Demzufolge erscheinen solche Modelle mit unstandardisierter Weichteilverletzung zur Untersuchung der regulären Frakturheilung nicht geeignet.

Die meisten Modelle basieren auf einem Guillotine-Mechanismus mit einer standardisierten Frakturvorrichtung. Das bekannteste und am häufigsten verwendete Modell wurde von Bonnarens und Einhorn beschrieben [28]. Mit Hilfe einer Frakturvorrichtung werden standardisierte geschlossene Frakturen nach intramedullärer Stabilisation mit einem Kirscher-Draht erzeugt. Die Fraktur des Knochens nach intramedullärer Stabilisierung kann jedoch zu einem Verbiegen des Kirschnerdrahtes mit daraus resultierender Fehlheilung des Knochens führen [5, 28]. Darüber hinaus entspricht der Frakturmechanismus nicht der klinischen Situation. Weitere Gruppen modifizierten das Vorgehen. Es wurden minimal-invasive Techniken verwendet [23]. An et al. wählten die Tibia, um das Weichteiltrauma zu reduzieren [5]. Alle beschriebenen Modelle stabilisierten den zu untersuchenden Knochen vor der Fraktur oder verwendeten unstandardisierte manuelle Frakturvorrichtungen [14].

Ziel war es daher, ein geschlossenes Frakturmodell an der Ratte zu entwickeln, das der klinischen Situation möglichst nahe ist und standardisiert reproduzierbar durchgeführt werden kann. Die Reposition und intramedulläre Stabilisation erfolgte nach Frakturerzeugung. Der dabei entstehende Weichteilschaden wurde gemessen, biomechanische Untersuchungen und histomorphometrische

Analysen 28, 42 und 84 Tage nach Fraktur durchgeführt.

Das modifizierte Frakturmodell ist leicht und reproduzierbar zu handhaben. Der induzierte Weichteilschaden unterlag nur geringen Schwankungen und erreichte zu keinem Zeitpunkt pathologische Kompartmentdrücke. Die biomechanischen Untersuchungen zeigten eindeutig einen Anstieg der torsionalen Stabilität der verheilenden Knochen im Verlauf. Das maximale Drehmoment stieg signifikant von 29,6 % im Vergleich zu der nicht frakturierten Gegenseite (Tag 28) über 76,9 % (Tag 42) auf 163,9 % am Tag 84. Ein vergleichbarer Anstieg fand sich bei der torsionalen Steifigkeit im Verlauf. Die histomorphometrischen Untersuchungen korrelierten mit den biomechanischen Ergebnissen und zeigten einen signifikanten Abfall der knorpeligen Anteile mit einem Anstieg der Mineralisation im Frakturkallus bei fortschreitendem Kallusremodeling. Verglichen mit der humanen Frakturheilung fanden sich abgesehen von der prozentualen Menge des Knorpelanteils und der Heilungsgeschwindigkeit vergleichbare Stadien der Frakturheilung [13, 257].

Die reproduzierbaren Ergebnisse bei geringer Ausfallrate und geringer Standardabweichung, erlaubten daher die Untersuchung des Einflusses stimulierender Substanzen auf die Frakturheilung unter Verwendung dieses Tiermodells [92, 206, 211].

3.3 Effekt der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung

3.3.1 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 auf die Frakturheilung der Ratte

In vitro und *in vivo* Studien belegen, dass Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth Factor-I (IGF-I), Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) und Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen [38, 91, 121, 149, 166, 190] und somit die Knochenheilung stimulieren [10, 273].

IGF-I und TGF-β1 zeigten viele gemeinsame, synergistische Effekte auf den Knochenstoffwechsel. Deshalb ist denkbar, dass sich die beiden Faktoren in ihren Wirkungen sowohl potenzieren als auch ergänzen können [168]. *In vitro* und *in vivo* Versuche ergaben eine dosisabhängige Wirksamkeit von IGF-I und TGF-β1 einzeln und kombiniert [76, 249]. Die kombinierte Applikation verfügte über einen größeren stimulierenden Effekt auf die Zunahme der Knochenmatrix als die jeweilige Einzelapplikation [120, 168]. Interaktionen zwischen IGF-I und TGF-β1 beeinflussen die Freisetzung und Organisation der Knochenmatrix und des Knorpels [250]. Beide stimulieren die Proliferation von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten während der Frakturheilung [148].

BMP-2 ist einer der am besten untersuchte Wachstumsfaktor und ist in der Lage in sämtlichen Geweben bei verschiedenen Spezies eine ektope Knochenbildung hervorzurufen [162, 262, 275].

Diese Fähigkeit kann therapeutisch genutzt werden, macht jedoch eine kontrollierte Freisetzung dieses hochpotenten Wachstumsfaktors unbedingt notwendig.

Ziel der durchgeführten experimentellen Studien war die Untersuchung des Effektes lokal applizierter Wachstumsfaktoren, einzeln und in Kombination, auf die Frakturheilung unter Verwendung des unter 2.2 entwickelten Frakturmodells.

Untersucht wurde der Effekt der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 und des Trägermaterials PDLLA sowie lokale und systemische unerwünschte Wirkungen.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikant größeren stimulierenden Effekt von IGF-I auf die Frakturheilung im Vergleich zur TGF-β1 Applikation. Die kombinierte Gabe beider Faktoren ergab einen signifikant größeren Effekt auf die torsionale Stabilität im Vergleich zur Einzelapplikation. Die histomorphometrischen Untersuchungen belegten ein beschleunigtes Kallusremodeling bei kombinierter Gabe mit signifikant mehr Mineralisation und weniger Knorpelanteilen 28 Tage nach Fraktur im Vergleich zur Einzelapplikation. Beide Faktoren scheinen daher auch *in vivo* einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung zu haben [208, 209].

Die Ergebnisse zeigten weiterhin in den mit IGF-I und TGF-β1 in Kombination behandelten Gruppen nach 42 Tagen in der radiologischen Untersuchung eine komplett durchbaute Fraktur, ein signifikant höheres maximales Drehmoment und eine signifikant höhere Torsionssteifigkeit in der biomechanischen Testung sowie histologisch ein fortgeschritteneres Remodeling im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Untersuchung der Serumparameter, des systemischen IGF-I und dessen Bindungsproteine sowie des Körpergewichtes und der Körpertemperatur ergaben keine Unterschiede in den Gruppen. Die Untersuchungen belegen, dass die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF-β1 aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten die Frakturheilung signifikant beschleunigt, wobei keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet werden konnten [206].

Die lokale Applikation von BMP-2 beschleunigte ebenso wie die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF-β1 die Frakturheilung signifikant. Es zeigte sich radiologisch eine fortgeschrittenere Frakturheilung, eine signifikant höhere biomechanische Stabilität sowie histologisch ein signifikant fortgeschritteneres Kallusremodeling durch die kontrollierte lokale Freisetzung von BMP-2 im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Deutliche Unterschiede zwischen IGF-I / TGF-β1 und BMP-2 konnten nicht festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei der Verwendung von BMP-2 auch außerhalb der Frakturzone eine größere Mineralisation der Kortikalis, die bei IGF-I / TGF-β1 nicht zu beobachten war [207, 214].

Die in die Beschichtung eingearbeitete Menge und die Freisetzung der Faktoren ist bezogen auf den Gesamtorganismus gering. 50 µg (5 % w/w) IGF-I, 10 µg (1 % w/w) TGF-β1 oder 50 µg (5 % w/w) BMP-2 wurden in das PDLLA eingearbeitet und kontinuierlich nach einem initialen Peak freigesetzt. Systemisch kam es zu keiner Änderung der gemessenen WF-Konzentration bzw. der Bindungsproteine (IGF-BP). Die Analyse von Blutbild und der Serumparameter (Elektrolyte, Schilddrüsenhormone und Glucose), des Körpergewichts und der Körpertemperatur zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die auf die lokale Applikation der Wachstmsfaktoren aus der Beschichtung zurückzuführen sein könnten. Eine Dosisfindungsstudie ergab bei Einarbeitung geringerer Konzentrationen an WF einen geringeren osteoinduktiven Effekt. Bei höheren Dosen konnte jedoch keine Steigerung der Knochenmatrixbildung induziert werden [99].

Die PDLLA-Beschichtung alleine, ohne eingearbeitete Wachstumsfaktoren, hatte bereits einen positiven Effekt auf die Frakturheilung. Wie es zu dieser Stimulation kommt, ist bisher nicht vollständig geklärt und muss in weiteren Studien näher untersucht werden. Durch das saure Milieu, welches bei dem Abbau von PDLLA entsteht, könnten Bindungen von WF und deren Bindungsproteine gelöst werden. Dies könnte zu einer erhöhten lokalen Konzentration von freien WF im Frakturkallus führen. Während für einige Biomaterialien auf Polymerenbasis negative Effekte, wie vermehrte Makrophagenansammlung oder Bildung eines Resorptionssaums beschrieben worden sind [165], zeigte die PDLLA-Beschichtung in diesen Studien keine unerwünschten lokalen Wirkungen in der Implantatumgebung.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die lokale und kontrollierte Applikation von WF aus einer

biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten eine effektive und sichere Methode darstellt, die Frakturheilung lokal zu beschleunigen.

3.3.2 Untersuchung des Langzeiteffektes lokal applizierter Wachstumsfaktoren

Neben der Charakterisierung von Wachstumsfaktoren [136], der Untersuchung über deren Lokalisation und Quantifizierung im Kallusgewebe [31, 49, 61, 276], der Wirkung auf verschiedene Zelltypen [37, 91, 139, 168, 250] und der Analyse der Signalkaskaden [51, 96], konzentriert sich die Forschung hauptsächlich auf den Effekt der WF auf Knochenstoffwechsel und Frakturheilung. Die Vorarbeiten haben eindeutig demonstriert, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren die frühe Phase der Frakturheilung stimuliert [181, 206, 207, 215]. Es zeigte sich eine signifikante Beschleunigung der Heilungsvorgänge im Frakturkallus. Biomechanische Untersuchungen ergaben, dass 28 bzw. 42 Tage nach Fraktur, die mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppen eine um den Faktor 3-4 größere torsionale Stabilität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen hatten. Unklar war jedoch ein möglicher Langzeiteffekt lokal freigesetzter Wachstumsfaktoren auf den Knochen-stoffwechsel.

Es sollte geklärt werden, ob dieser dramatische stimulierende Effekt der WF weiter anhält und zu einer überschießenden Kallusbildung führt oder ob sich die Heilungsabläufe nach anfänglicher Beschleunigung wieder auf ein physiologisches Level einpendeln.

In Übereinstimmung mit den Voruntersuchungen zeigte sich in der WF Gruppe eine deutliche Stimulierung der Frakturheilung in der Frühphase im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Nach 84 Tagen ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nachweisen. Die torsionalen Steifigkeiten, die knorpeligen Anteile und die Mineralisationen im Kallusgewebe glichen sich im zeitlichen Verlauf an. Es fanden sich ferner keine lokalen oder systemischen unerwünschten Wirkungen durch die Wachstumsfaktorenapplikation mit regelhafter Kalluszusammensetzung. Es kam zu einem Angleichen der Heilungsabläufe.

Die lokale Applikation der WF aus der PDLLA-Beschichtung von Implantaten führte zu einer anfänglichen Beschleunigung der Frakturheilung ohne die physiologischen Heilungsvorgänge im weiteren Verlauf zu beeinflussen [212, 216]. Für eine klinische Anwendung dieser bioakitven Oberflächenbeschichtungen spielt dies eine entscheidende Rolle.

3.3.3 Untersuchung der lokalen Applikation von IGF-I und TGF-β1 auf die Osteotomieheilung beim Schwein

Die unter 2.3 bis 2.4 durchgeführten Untersuchungen ergaben eine signifikante Beschleunigung der Frakturheilung im Rattenmodell durch die lokale Applikation von IGF-I, TGF-β1 und BMP-2. Da jedoch nicht nur biologische Einflussgrößen, sondern auch biomechanische Belastungen die Frakturheilung beeinflussen, sollte in einem Großtiermodell der Effekt lokal freigesetzter Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung untersucht werden.

Ferner sollte an einer dem Menschen näher verwandten Spezies mögliche lokale und systemische Effekte der freigesetzten WF näher analysiert werden.

Eine Osteotomie des Tibiaschaftes von Yukatan-Minischweinen wurde mit beschichteten versus unbeschichteten Titan-Tibianägeln intramedullär stabilisiert und statisch verriegelt. Es folgten Röntgenuntersuchungen, Analyse der Blutparameter (einschließlich IGF-I und IGF-I - Bindungsproteine) sowie Bestimmung des Körpergewichts und der Temperatur im Verlauf. Nach 28 Tagen wurden beide Tibiae entnommen, biomechanisch getestet und histomorphometrisch analysiert.

Es zeigten sich keine Unterschiede in den erhobenen Blutparametern, Körpergewicht oder Temperatur zwischen den Gruppen. Es konnten auch im Großtiermodell weder lokale noch systemische unerwünschte Wirkungen der Wachstumsfaktoren oder des Trägermaterials PDLLA festgestellt werden. Die Röntgenuntersuchungen ergaben eine signifikant beschleunigte Osteotomieheilung in der Wachstumsfaktorengruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit einer signifikant höheren torsionalen Stabilität und histomorphometrisch fortgeschrittenerer Defektheilung. Ebenso wie im Kleintiermodell fand sich bei der PDLLA-Beschichtung ohne eingearbeitete WF ein stimulativer Effekt auf die Heilungsvorgänge

Aus diesen Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren aus PDLLA beschichteten Implantaten auch im Großtiermodell signifikant die Heilungsvorgänge im Knochen ohne lokale oder systemische Nebenwirkungen stimuliert [181].

3.4 Effekt der systemischen Applikation von Wachstumshormon im Vergleich zur lokalen Wachstumsfaktorengabe

Die Vorarbeiten haben gezeigt, dass die kombinierte Gabe von IGF-I und TGF-β1 zu einer signifikanten Beschleunigung der Frakturheilung bei der Ratte und beim Schwein führte [181, 206]. IGF-I und TGF-β1 scheinen dabei einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung zu haben [208].

Des weiteren ließ sich durch die systemische Applikation von Wachstumshormon eine signifikant verbesserte Konsolidierung bei der Distraktionsosteogenese sowie bei der Knochendefektheilung am Schwein erzielen [12, 180, 182].

In dieser Studie wurde daher die Wirkung der lokalen Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 im Vergleich zur systemischen Applikation von Wachstumshormon auf die Frakturheilung untersucht.

Spezies-spezifisches-Wachstumshormon wurde systemisch (2 mg pro kg Körpergewicht) durch tägliche subkutane Injektionen verabreicht. Nach radiologischen Verlaufsuntersuchungen wurden die Versuchstiere 28 Tage nach Fraktur getötet und die Tibiae histologisch und biomechanisch untersucht.

Die Ergebnisse ergaben in Übereinstimmung mit den Vorarbeiten eindeutig einen stimulierenden Effekt der beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 auf die Frakturheilung gegenüber den Kontrollgruppen. Alle untersuchten Präparate zeigten histomorphologisch eine reguläre Kalluszusammensetzung mit knorpeligen und mineralisierten Anteilen. Es fanden sich keine Anzeichen für reduzierte oder überschießende Kallusbildung. Auch an der Nageleintrittsstelle konnte keine vermehrte Kallusbildung nachgewiesen werden.

Die systemische Applikation von Wachstumshormon führte ebenfalls zu einer signifikanten Beschleunigung der Frakturheilung gegenüber der Kontrollgruppe. Histologisch fand sich ein beschleunigtes Kallusremodeling mit signifikant weniger knorpeligen Anteilen und mehr mineralisierten Arealen. Durch die kombinierte Applikation der Wachstumsfaktoren unter gleichzeitiger GH-Gabe konnte jedoch keine weitere Steigerung der Heilungsvorgänge erreicht werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass sowohl durch die lokale Wachstumsfaktorengabe, als auch durch das systemisch applizierte Wachstumshormon bereits eine maximale Steigerung der Heilungsprozesse erreicht worden ist. Es wäre daher denkbar, dass bereits eine Grenze der Stimulierbarkeit erreicht worden ist. Darüber hinaus könnten Regulationsmechanismen die Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren beeinflussen. Es ist bekannt, dass die IGF-I Produktion durch sogenannte negative „Feed back“-Mechanismen reguliert wird und einen indirekten Einfluss auf die GH-Expression hat [113].

Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein. Die systemische Applikation von IGF-I in Kombination mit GH zeigte keinen additiven Effekt auf das Knochenlängenwachstum bei Ratten [95].

Betrachtet man die systemischen Wirkungen des applizierten Wachstumshormons, so fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der biomechanischen Stabilität der kontralateralen Tibiae im Vergleich zu den Wachstumsfaktoren- bzw. Kontrollgruppen. Kein Unterschied zeigte sich in den erhobenen Blut- und Serumparametern oder den Plasmaspiegeln von IGF-I und dessen Bindungsproteinen. Das Körpergewicht der GH-Tiere nahm im Verlauf des Versuches signifikant, im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen zu.

Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Studien, die sich ebenfalls mit dem systemischen Effekt von GH befassten. Bak untersuchte den Einfluss verschiedener Dosen von Wachstumshormon auf die Frakturheilung in einem Rattenmodell [15]. Dosen zwischen 0,08 und 10 mg GH pro kg Körpergewicht wurden täglich verabreicht. Signifikante Wirkungen auf die biomechanische Stabilität der frakturierten Knochen konnten bei Applikation von 2 und 10 mg GH festgestellt werden. Bak beobachtete ebenfalls keinen Anstieg der Steifigkeit, lediglich einen Effekt auf das maximale Drehmoment der kontralateralen Tibiae und keinen Einfluss auf den IGF-I Spiegel bei täglicher Gabe von 2 mg des Hormons.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren, als auch die systemische Gabe von Wachstumshormon einen deutlichen Effekt auf die Frakturheilung in dieser Studie zeigten. Die gewonnenen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Kenntnissen aus der Literatur. Die kombinierte Anwendung beider Stimulationsmöglichkeiten führte zu keiner weiteren Steigerung der Heilungsvorgänge. Es konnte kein additiver Effekt festgestellt werden [215].

3.5 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellproliferation und Differenzierung in vitro und in vivo

Die unter 2.1 bis 2.6 durchgeführten Studien lassen einige Fragen offen. Weitere Untersuchungen sollten hinsichtlich der genauen Rolle und Interaktion der Wachstumsfaktoren durchgeführt werden. Vor allem die Frühphase scheint eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung einzunehmen. Die zellulären Mechanismen bei der unbeeinflussten und beeinflussten Frakturheilung wurden daher betrachtet.

Die *in vitro* Untersuchungen mit beschichteten versus unbeschichteten Titanimplantaten an einer humanen Osteoblasten-Zelllinie ergaben keine Unterschiede der Zellvitalität oder der pH-Werte der unterschiedlichen Kulturen. Es zeigten sich keine Unterschiede in Proliferation, metabolischer Aktivität und Kollagen I Produktion zwischen der Kontrollgruppe und den unbeschichteten sowie PDLLA-beschichteten Gruppen. Unter dem Einfluss der WF demonstrierten die Osteoblasten jedoch einen signifikanten Anstieg der Kollagen I Produktion mit einem Abfall der proliferativen und metabolischen Aktivität. Es fand sich kein Unterschied bezüglich der Kollagen I Produktion in Abhängigkeit von den Inkubationszeiten. Ferner zeigten Versuche an Maus-Makrophagen keinen Effekt des konditionierten Mediums aus den Osteoblastenversuchen auf die IL-1 Produktion [210].

Um die Rolle und Interaktion der Wachstumsfaktoren während der Frühphase der Frakturheilung *in vivo* zu untersuchen, wurden zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung 5, 10 und 15 Tage nach Fraktur *in vivo* analysiert [268]. Es ergaben sich Unterschiede bezüglich der Kallusmorphologie und der Proliferationsrate unter dem Einfluss der lokal applizierten Wachstumsfaktoren. Am Tag 5 zeigte sich in der mit WF behandelten Gruppe ein früheres Auftreten von Knorpelgewebe mit starker Proliferationsaktivität in den Chondrozyten. An den Tagen 10 und 15 fand sich eine fortgeschrittenere Kallusreifung mit gesteigerter Proliferationsaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den durchgeführten *in vitro* Untersuchungen und stellen ein weiteres Indiz für die Stimulation der zellulären Prozesse durch lokal applizierte WF in der Frühphase der Frakturheilung dar [268].

3.6 Osteogenese und Vaskularisation im Verlauf der Frakturheilung bei lokaler Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1

Im Verlauf des Heilungsprozesses sind Vaskularisation und Osteogenese des Frakturkallus essentielle Faktoren für eine erfolgreiche Knochenheilung. Angiogenese und Durchblutung im Bereich der Fraktur sind entscheidend für die nutritive Versorgung der regenerierenden Zellen und Gewebetypen. Mesenchymale Stammzellen und Vorläuferzellen der Osteogenese, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Proteine, Mineralien, Sauerstoff und Nährstoffe sind nur einige der Faktoren, die über das Blut zugeführt werden [65]. Ohne eine ausreichende Vaskularisation des Kallus und des Knochens ist eine regelhafte Chondrogenese und Osteogenese im Verlauf der Frakturheilung nicht möglich [78]. Die Angiogenese wird dabei von zahlreichen Angiogenen- und Wachstumsfaktoren gefördert und reguliert: VEGF, PDGF, FGF, IGF-I/II, TGF-β u.a. [78, 79, 80, 86].

Bereits in der Phase des Frakturhämatoms werden angiogen wirkende Faktoren sezerniert, um eine frühzeitige Vaskularisation im Bereich der Fraktur zu gewährleisten [235]. Knochen- und Knorpelzellen sind in der Lage, reguliert angiogene Faktoren freizusetzen. Dies lässt darauf schließen, dass die Osteogenese durch die lokale Produktion dieser Faktoren verstärkt wird.

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass osteoblastäre Zellen in der Lage sind, VEGF, einen angiogenen Faktor, zu sezernieren. Prostaglandin E2 (PGE2), ein die Knochenbildung stimulierendes Prostaglandin, verstärkt ebenfalls die Bildung von VEGF [86].

In humanen osteoblastären Zellen konnte eine IGF-I stimulierte Expression von VEGF nachgewiesen werden, ein weiterer Hinweis für die enge Verbindung zwischen Osteo- und Angiogenese im Verlauf der Frakturheilung [80].

Eine ausgewogene Balance zwischen angiogener und antiangiogener Aktivität erscheint essentiell für den regelhaften Ablauf der Knochenbildung zu sein. Eine übermäßige Angiogenese kann zu einer verstärkten Resorption des Knochens führen, während eine mangelnde Vaskularisierung die Knochenneubildung inhibiert kann [47].

Alpha-smooth muscle actin (α–SMA), eine Isoform des kontraktilen Filaments Actin, wird von glatten Muskelzellen, Perizyten und Myofibroblasten exprimiert. Antikörper zum Nachweis dieses Proteins haben sich seit langem für die Darstellung von Gefäßen im Rahmen der Immunhistologie bewährt [107, 177, 246].

Die Regeneration neuer Knochensubstanz ist Bedingung für Stabilität und Wiederherstellung der ursprünglichen Kontinuität. Zahlreiche Wachstumsfaktoren beeinflussen den Heilungsprozess durch Steuerung der Osteoblastendifferenzierung und -proliferation.
Als sensitiver Marker der Differenzierung osteogener Zellen bei Ratten hat sich E11, ein Protein der Zelloberfläche, bewährt, das während der Transformation von Osteoblasten zu Osteozyten

exprimiert wird [218]. Mit E11 ist es möglich, einen definierten Zeitpunkt im Verlauf der Knochenbildung nachzuweisen und zu vergleichen, da er anders als andere Osteoblastenmarker, wie Osteokalzin, Osteopontin oder Fibronectin nicht in allen Stadien der Osteoblastenreifung exprimiert wird [218].

Die Ergebnisse der beiden immunhistologischen Färbungen mit den Antikörpern gegen E11 und α-smooth muscle actin weisen darauf hin, dass es in der mit Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 behandelten Gruppe zu einer beschleunigten Heilung des Knochens und einem schnelleren Ablauf der Phasen der Frakturheilung kommt. Sowohl die Phase der Angiogenese und Knochenbildung, als auch die des Remodeling des Frakturkallus sind unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und PDLLA früher zu beobachten, als bei der Kontrollgruppe. Die Zeit der Frakturheilung, der Kallusbildung und Regeneration des fakturierten Knochens ist gegenüber der Kontrollgruppe verkürzt [233, 234].

3.7 Quantifizierung, Lokalisation und Expression von Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine geeignete Methode zur Quantifizierung von WF im Knochen-/Kallusgewebe mittels ELISA etabliert und erstmals die Konzentrationen von IGF-I und TGF-β1 sowie die Gesamt-Proteinkonzentration (P_{ges}) in der Frühphase der Frakturheilung nach 5, 10 und 15 Tagen bestimmt. Die Messungen erfolgten einerseits während der unbeeinflussten physiologischen Frakturheilung und andererseits unter dem Einfluss von IGF-I und TGF-β1.

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse eine starke Zunahme der Konzentrationen von IGF-I und TGF-β1 in der Frühphase der unbeeinflussten Frakturheilung. Während sich die P_{ges} und der IGF-I Anteil stetig erhöhten, scheint der TGF-β1-Anteil einem weitgehend konstanten Verlauf zu unterliegen. Die gewonnenen Resultate vervollständigen und stützen die immunhistologischen, biochemischen und molekularbiologischen Erkenntnisse, die einen stimulierenden Einfluss der Faktoren auf Stoffwechselvorgänge, Zellproliferation und -differenzierung während der Frakturheilung ergaben. Die Änderungen in der Proteinmenge des Kallus durch WF-Applikation lassen auf eine fortgeschrittene Heilung durch einen Abbau von Knorpel- und Bindegewebe schließen. Bei der Quantifizierung der Wachstumsfaktoren war am Tag 15 nach Fraktur ein signifikanter Unterschied zu messen. Hier war die Konzentration von IGF-I/P_{ges} in der WF-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Zu den verschiedenen Zeitpunkten konnten weder bei der Quantifizierung der TGF-β1 Konzentration, noch bei den IGF-I Konzentrationen signifikante Veränderungen durch die lokale WF-Applikation gemessen werden. Es zeigte sich, dass die lokale Applikation der WF zu keiner Änderung der physiologischen WF-Konzentration zu den untersuchten Zeitpunkten führte [266, 267].

Die durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen lassen zusammenfassend eindeutig den Schluss zu, dass die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF-β1 durch Stimulation zahlreicher zellulärer Mechanismen vor allem die Frühphase der Frakturheilung positiv beeinflusst.

3.8 Weitere Anwendungen der entwickelten Beschichtungstechnologie

3.8.1 Lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten PDLLA-Cages bei der intervertebralen Spondylodese

Neben der Stimulation der Fraktur- und Osteotomieheilung war es Ziel weiterer Untersuchungen, den Effekt von lokal applizierten Wachstumsfaktoren von PDLLA-beschichteten Cages auf die intervertebrale zervikale Spondylodese am Schafsmodell zu untersuchen, um somit die Basis für eine optimierte Fusion der Halswirbelsäule zu schaffen. In mehreren *in vivo* Studien zeigte sich, dass die biodegradierbare PDLLA-Beschichtung intervertebraler Implantate eine sichere, einfache und effektive Applikation von IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 im Intervertebralraum gewährleistet. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der PDLLA-Carrier einem Kollagen-Carrier in seiner Effektivität signifikant überlegen ist. Nebenwirkungen der PDLLA-Beschichtung konnten auch in diesen Untersuchungen nicht gefunden werden. In einer Dosisfindungsstudie wurde die kombinierte Applikation von IGF-I und TGF-β1 mittels PDLLA-beschichtetem Cage evaluiert. Dabei zeigten eine mittlere und hohe Dosis von IGF-I und TGF-β1 einen signifikanten osteoinduktiven Effekt. Speziell die mittlere Dosis von 150 µg IGF-I (5 % w/w) plus 30 µg TGF-β1 (1 %w/w) wies dabei die größte Effektivität auf, da bei geringeren Dosen der osteoinduktive Effekt ausblieb und bei höheren Dosen keine Steigerung der Knochenmatrixbildung induziert werden konnte. Zusätzlich waren für alle IGF-I und TGF-β1 Dosierungen keine unerwünschten Wirkungen auf die erhobenen Laborparameter, das Körpergewicht oder die Körpertemperatur nachweisbar. Die Applikation von IGF-I und TGF-β1 mittels PDLLA-beschichteten Cages war in der Lage, die intervertebrale Spondylodese signifikant zu stimulieren. Des weiteren konnte demonstriert werden, dass die verwendeten Wachstumsfaktoren BMP-2 bzw. IGF-I und TGF-β1 eine signifikante Verbesserung der intervertebralen Fusionsergebnisse im Vergleich zu autologem Knochenmaterial ermöglichten und gleichzeitig die Entnahme dieses Knochenmaterials überflüssig machen. Die Applikation von IGF-I und TGF-β1 mittels PDLLA-Carrier zeigte im Vergleich zum bisherigen experimentellen „golden standard“ - BMP-2 appliziert mittels Kollagen-Carrier - signifikant bessere Fusionsergebnisse [99, 100, 101].

3.8.2 Lokale Applikation von Antibiotika aus einer PDLLA-Beschichtung von Implantaten zur Prophylaxe der Implantat-assoziierten Osteomyelitis

Infektionen stellen weiterhin eine sehr ernste Komplikation in der orthopädischen und unfallchirurgischen Chirurgie dar. Assoziiert mit Fremdkörpern wie Prothesen oder anderen Implantaten, sind Knocheninfektionen schwer zu therapieren. Nicht selten muss das infizierte Implantat entfernt werden [21, 202, 202, 239], multiple Revisionseingriffe und Langzeitbehandlungen mit Antibiotika sind in der Folge häufig notwendig [227, 237, 261, 270].

Staphylococcus aureus und koagulase negative Staphylokokken (Staph. epidermidis) können in 70 – 90 % der tiefen Wundinfektionen isoliert werden [202, 239].

Diese Bakterien haben eine hohe Affinität zu Knochen und sind in der Lagen sich durch Glykokalix-Bildung vor einer systemischen Antibiose zu schützen [85].

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von Implantaten mit PDLLA signifikant die Adhäsion von Mikroorganismen an der Implantatoberfläche reduziert [213]. Gentamicin lässt sich, ebenso wie Wachstumsfaktoren, in eine PDLLA-Beschichtung von Implantaten einarbeiten. Nach Etablierung eines Infektmodells [129], wurde der Effekt einer Gentamicin-haltigen PDLLA-Beschichtung von Implantaten untersucht. Durch diese Beschichtung konnte die Rate an implantat-assoziierten Infekten am Tiermodell der Ratte signifikant reduziert werden [128, 129, 130].

Basierend auf diesen Ergebnissen steht der Einsatz PDLLA-Gentamicin beschichteter intramedullärer Tibianägel kurz vor der klinischen Anwendung.

3.9 Klinische Relevanz

Die unfallchirurgische und orthopädische Forschung der letzten Jahrzehnte konzentrierte sich auf die Entwicklung und Verbesserung von Implantatsystemen. Es steht uns heute für nahezu jeden Frakturtyp ein entsprechendes Implantat zur Verfügung. Aus biomechanischer Sicht dürfte eine Stufe der Entwicklung erreicht sein, die sich durch weitere Entwicklungen nur unwesentlich verändern wird. Die Behandlung von Frakturen ist jedoch auch weiterhin mit zahlreichen Komplikationen und Risiken verbunden [64].

Eine Lösung für weiterhin bestehende Behandlungsprobleme in der Frakturheilung ist in den kommenden Jahren durch Verbesserungen der Implantate nicht zu erwarten, da die Ursachen dieser Probleme in erster Linie biologischer und nicht biomechanischer Natur sind.

Wachstumsfaktoren und Hormone sind wichtige Steuerelemente des Knochenmetabolismus [120]. Sie haben somit das Potential neue therapeutische Wege in komplexen klinischen Situationen aufzuzeigen.

In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten diskutiert, wie die Frakturheilung mit Hilfe von Faktoren, wie IGF-I, TGF-β1 oder BMPs, positiv beeinflusst werden kann. Eine große Herausforderung bei der Forschung auf diesem Gebiet besteht zudem darin, geeignete Applikationsformen zu entwickeln, die eine optimale Wirkung der Faktoren gewährleisten und das Risiko von Nebenwirkungen minimieren. In bisherigen Ansätzen werden die Faktoren entweder systemisch, durch Injektionen und Katheter, oder lokal, mittels osmotischer Minipumpen und subperiostaler Injektionen, verabreicht [95, 98, 123, 159, 160, 183]. Eine weitere Möglichkeit der lokalen Applikation besteht in der Einarbeitung der Wachstumsfaktoren in Trägermaterialien wie Kollagenschwämmen, Gele und Membranen, die operativ direkt an den Wirkort gebracht werden müssen [22, 36, 264]. Obwohl hier Effekte der Faktoren auf Knochengewebe und -stoffwechsel nachweisbar sind, erscheinen diese Methoden für die klinische Anwendung unpraktikabel.

Durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren Beschichtung von Implantaten, wird das osteosynthetische Material zugleich „Carrier“ für Wirksubstanzen, die direkt am gewünschten Wirkort stimulierend auf die Frakturheilung Einfluss nehmen können. Die Osteosynthesematerialien können dabei ohne Veränderung des Materialdesigns mit PDLLA als Trägermaterial und Wachstumsfaktoren beschichtet werden. Mit dem „kalten Beschichtungsverfahren“ lassen sich Wachstumsfaktoren in stabiler Form in die lackartige biodegradierbare Polylaktid-Schicht auf Osteosynthesematerialien auftragen. Die Faktoren sind hierbei als feine Suspension in der Beschichtung verteilt und werden v.a. durch Diffusions- und Erosionsvorgänge lokal und kontrolliert freigesetzt. Das Trägermaterial PDLLA ist inert und wird vollständig vom Organismus metabolisiert. Die durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen belegen eindeutig einen stimulierenden Effekt lokal freigesetzter Wachstumsfaktoren auf die Heilungsvorgänge am Knochen. Weder lokal noch systemisch konnten unerwünschte

Nebenwirkungen festgestellt werden.

Mögliche klinische Einsatzmöglichkeiten finden sich bei verzögerter Frakturheilung, der Knochendefektheilung, der intervertebralen Spondylodese oder im Bereich der Implantologie.

Auch weitere Substanzen, wie Antibiotika, lassen sich in die Beschichtung einarbeiten. Durch die Gentamicin-haltige biodegradierbare PDLLA-Beschichtung von Titanimplantaten konnte die Rate an implantat-assoziierten Infekten *in vitro* und *in vivo* signifikant reduziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen steht der Einsatz PDLLA-Gentamicin beschichteter intramedullärer Tibianägel kurz vor der Zulassung durch die entsprechenden Behörden.

Durch die klinische Anwendung dieser Technologie könnte die Komplikationsrate in der orthopädischen und unfallchirurgischen Chirurgie weiter reduziert werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Wachstumsfaktoren sind wichtige Steuerelemente des Knochenzellmetabolismus. Im Verlauf der Frakturheilung kommt es zur Ausschüttung von zahlreichen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Botenstoffen im und um den Bereich des Frakturspalts, die systemisch oder lokal, endokrin, parakrin oder autokrin wirksam werden können. Für verschiedene Wachstumsfaktoren konnten in zahlreichen Studien osteoinduktive und die Frakturheilung positiv beeinflussende Wirkungen nachgewiesen werden [76, 197, 264, 278]. *In vitro* und *in vivo* Studien belegen, dass einige dieser Faktoren wie Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) und Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen [159] und somit die Knochenheilung stimulieren [273]. Der genaue Wirkmechanismus dieses positiven Effektes der Wachstumsfaktoren und ihre Interaktion im Verlauf der Frakturheilung ist nicht bekannt.

Die lokale Applikation der Faktoren für einen therapeutischen Einsatz bei der Frakturheilung stellte bisher jedoch ein Problem dar.

Mit der entwickelten biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Implantaten können eingearbeitete Wachstumsfaktoren kontrolliert und lokal direkt an der Fraktur freigesetzt werden. Das beschichtete Implantat dient dabei der Stabilisation der Fraktur und gleichzeitig als Wirkstoffträger. Die Beschichtung weist eine hohe mechanische Stabilität auf. Die eingearbeiteten Wachstumsfaktoren behalten ihre biologische Aktivität in der Beschichtung und werden kontrolliert lokal freigesetzt.

Um den Effekt lokal applizierter Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung zu untersuchen, wurde ein standardisiertes geschlossenes Frakturmodell entwickelt, das der klinischen Situation möglichst nahe ist und reproduzierbar durchgeführt werden kann.

Untersucht wurde der Effekt der Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF-β1 und BMP-2 und des Trägermaterials PDLLA sowie lokale und systemische unerwünschte Wirkungen.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikant größeren stimulierenden Effekt von IGF-I auf die Frakturheilung im Vergleich zur TGF-β1 Applikation. Die kombinierte Gabe beider Faktoren ergab einen signifikant größeren Effekt auf die torsionale Stabilität und die Kallusreifung im Vergleich zur Einzelapplikation. Beide Faktoren scheinen einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung zu haben. Die lokale Applikation von BMP-2 beschleunigte ebenso, wie die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF-β1 die Frakturheilung signifikant. Deutliche Unterschiede zwischen IGF-I / TGF-β1 und BMP-2 konnten nicht festgestellt werden. Allerdings zeigte sich bei der Verwendung von BMP-2 auch außerhalb der Frakturzone eine größere Mineralisation der Kortikalis, die bei IGF-I / TGF-β1 nicht zu beobachten ist. Auch im Großtiermodell bestätigte sich die Wirksamkeit dieser bioaktiven Oberflächen-beschichtung auf die Osteotomieheilung. Die PDLLA-Beschichtung alleine, ohne

eingearbeitete Wachstumsfaktoren, zeigte bereits einen positiven Effekt auf die Frakturheilung.

Die Untersuchungen belegen, dass die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten die Frakturheilung signifikant beschleunigt, wobei keine unerwünschten lokalen oder systemischen Wirkungen beobachtet werden konnten.

Bei dem Vergleich lokaler (durch Wachstumsfaktoren) mit systemischer Stimulationsmöglichkeit (durch Wachstumshormon) der Frakturheilung lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die kombinierte Anwendung beider Stimulationsmöglichkeiten zu keiner weiteren Steigerung der Heilungsvorgänge führte. Weitere Untersuchungen wurden hinsichtlich der genauen Rolle und Interaktion der Wachstumsfaktoren durchgeführt. Vor allem die Frühphase scheint hierbei eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung einzunehmen. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Stimulation der Osteoblastendifferenzireung mit einer Erhöhung der Kollagen-1 Produktion *in vitro* sowie eine Steigerung der Proliferationsrate und Angiogenese mit einem schnelleren Ablauf der Phasen der Frakturheilung *in vivo* durch lokal appliziertes IGF-I und TGF-β1.

Weitere Anwendungen der entwickelten Beschichtungstechnologie stellen die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten PDLLA-Cages bei der intervertebralen Spondylodese sowie die lokale Applikation von Antibiotika aus einer PDLLA-Beschichtung von Implantaten zur Prophylaxe der Implantat-assoziierten Osteomyelitis dar. Basierend auf diesen Ergebnissen steht der Einsatz PDLLA-Gentamicin beschichteter intramedullärer Tibianägel kurz vor der klinischen Anwendung. Eine Zulassung durch die entsprechenden Behörden ist erfolgt. Die klinische Anwendung Wachstumsfaktoren-beschichteter Implantate ist bereits in der Vorbereitung.

Aufbauend auf den Stand der Forschung und den eigenen Arbeiten, soll ausblickend anhand spezifischer Zellkulturstudien an Primärzellen der Einfluss und die Interaktion relevanter WF auf Osteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten und Chondrozyten im zeitlichen Verlauf detaillierter untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufschlüsse zur Weiterentwicklung biologischer Einflussmöglichkeiten auf den Knochenstoffwechsel und zur Rolle und Interaktion von WF während der Frakturheilung liefern.

Anhang

Literaturverzeichnis

[1] Abrahamsson, S. O.; Lundborg, G. und Lohmander, L. S. (1991): Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon, J.Orthop Res. (Band 9), Nr. 4, Seite 495-502.

[2] Agrawal, C. M.; Best, J.; Heckman, J. D. und Boyan, B. D. (1995): Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions, Biomaterials (Band 16), Nr. 16, Seite 1255-1260. URL: PM:8589196

[3] Agrawal, C. M.; Pennick, A.; Wang, X. und Schenck, R. C. (1997): Porous-coated titanium implant impregnated with a biodegradable protein delivery system, J Biomed.Mater.Res (Band 36), Nr. 4, Seite 516-521.

[4] Amarnani, S.; Merriman, H. L.; Linkhart, T. A.; Baylink, D. J. und Mohan, S. (1993): Autocrine regulators of MC3T3-E1 cell proliferation, J Bone Miner Res (Band 8), Nr. 2, Seite 157-165. URL: PM:7680184

[5] An, Y.; Friedman, R. J.; Parent, T. und Draughn, R. A. (1994): Production of a standard closed fracture in the rat tibia, J.Orthop.Trauma. (Band 8), Nr. 2, Seite 111-115.

[6] Andreassen, T. T.; Jorgensen, P. H.; Flyvbjerg, A.; Orskov, H. und Oxlund, H. (1995): Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats, J.Bone Miner.Res. (Band 10), Nr. 7, Seite 1057-1067.

[7] Andrew, J.; Hoyland, J.; Freemont, A. und Marsh, D. (1993): Insulin like growth factor gene expression in human fracture callus, Calcif Tissu Int (Band 53), Seite 97-102.

[8] Aro, H. T.; Wippermann, B. W.; Hodgson, S. F. und Chao, E. Y. (1990): Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing, J Orthop.Res (Band 8), Nr. 2, Seite 238-246.

[9] Ashhurst DE; Hogg J und Perren SM (1982): A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia., Injury (Band 14), Nr. 3, Seite 236-242.

[10] Aspenberg, P.; Wang, E. und Thorngren, K. G. (1992): Bone morphogenetic protein induces bone in the squirrel monkey, but bone matrix does not , Acta Orthop.Scand. (Band 63), Nr. 6, Seite 619-622.

[11] Bail H; Raschke M; Kolbeck, S.; Krummrey G; Windhagen, H. J.; Weiler A; Raun K; Mosekilde L und Haas NP (2002): Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis., Bone (Band 30), Nr. 1, Seite 117-124.

[12] Bail, H. J.; Kolbeck, S.; Krummrey, G.; Schmidmaier, G.; Haas, N. P. und Raschke, M. J. (2002): Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing, Horm.Res (Band 58 Suppl 3), Seite 39-42. URL: PM:12435896

[13] Bak, B. (1993): Fracture healing and growth hormone - A biochemical study in the rat, Dan Med Bull (Band 40), Seite 519-536.

[14] Bak, B. und Andreassen, T. T. (1988): Reduced energy absorption of healed fracture in the rat, Acta Orthop.Scand. (Band 59), Nr. 5, Seite 548-551.

[15] Bak, B.; Jorgensen, P. und Andreassen, T. (1990): Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat, Acta Orthop Scand (Band 61), Seite 54-57.

[16] Bak, B.; Jorgensen, P. und Andreassen, T. (1991): The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration, Clin Orth Rel Res (Band 264), Seite 295-301.

[17] Baltzer AW; Lattermann C; Whalen JD; Wooley P; Weiss K; Grimm M; Ghivizzani SC; Robbins PD und Evans CH (2000): Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene, Gene Therapy (Band 7), Nr. 9, Seite 734-739.

[18] Barnes, G. L.; Kostenuik, P. J.; Gerstenfeld, L. C. und Einhorn, T. A. (1999): Growth factor regulation of fracture repair, J.Bone Miner.Res. (Band 14), Nr. 11, Seite 1805-1815.

[19] Bax, B. E.; Wozney, J. M. und Ashhurst, D. E. (1999): Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia, Calcif.Tissue Int. (Band 65), Nr. 1, Seite 83-89.

[20] Baylink, D.; Finkelman, R. und Mohan, S. (1993): Growth factors to stimulate bone formation, J Bone Miner Res (Band 8,Supplement 2), Seite 565-572.

[21] Beck, A.; Kinzl, L. und Bischoff, M. (1999): [Antibiotic prophylaxis and therapy in trauma surgery], Unfallchirurg (Band 102), Nr. 12, Seite 955-966.

[22] Beck, L.; Amento, E.; Xu, Y.; Deguzman, L.; Lee, W.; Nguyen, T. und Gillet, N. (1993): TGF-beta1 induces bone closure of skull defects - Temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta1, J Bone Miner Res (Band 8), Nr. 6, Seite 753-761.

[23] Bhandari M und Shaughnessy S (2001): A minimally invasive percutaneous technique of intramedullary nail insertion in an animal model of fracture healing., Arch Orthop Trauma Surg (Band 121), Nr. 10, Seite 591-593.

[24] Bier H (1920): Experimentelle Erfahrungen über Pseudarthrosenbildung, Münchner medizinische Wochenschrift (Band 67), Seite 22.

[25] Blumenfeld, I.; Srouji, S.; Lanir, Y.; Laufer, D. und Livne, E. (2002): Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1, Exp.Gerontol. (Band 37), Nr. 4, Seite 553-565. URL: PM:11830358

[26] Bolander ME (1992): Regulation of fracture repair by growth factors., Proc Soc Exp Biol Med (Band 200), Nr. 2, Seite 165-170.

[27] Bonewald, L. F. und Dallas, S. L. (1994): Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation, J Cell Biochem. (Band 55), Nr. 3, Seite 350-357. URL: PM:7962167

[28] Bonnarens, F. und Einhorn, T. A. (1984): Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone, J.Orthop.Res. (Band 2), Nr. 1, Seite 97-101.

[29] Bortell, R.; Barone, L. M.; Tassinari, M. S.; Lian, J. B. und Stein, G. S. (1990): Gene expression during endochondral bone development: evidence for coordinate expression of transforming growth factor beta 1 and collagen type I, J Cell Biochem. (Band 44), Nr. 2, Seite 81-91. URL: PM:2250045

[30] Bostrom, M. P.; Lane, J. M.; Berberian, W. S.; Missri, A. A.; Tomin, E.; Weiland, A.; Doty, S. B.; Glaser, D. und Rosen, V. M. (1995): Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing, J.Orthop.Res. (Band 13), Nr. 3, Seite 357-367.

[31] Bourque WT; Gross M und Hall BK (1993): Expression of four growth factors during fracture repair., Int J Dev Biol (Band 37), Nr. 4, Seite 573-579.

[32] Bouxsein ML; Turek TJ; Blake CA; D'Augusta D; Li X; Stevens M; Seeherman HJ und Wozney JM (2001): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model., J Bone Joint Surg Am (Band 83), Nr. 8, Seite 1219-1230.

[33] Boyne, P. J. (2001): Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects, J.Bone Joint Surg.Am. (Band 83-A Suppl 1), Nr. Pt 2, Seite S146-S150. URL: PM:11314792

[34] Brunner, A.; Minamitake, Y. und Gopferich, A. (1998): Labelling peptides with fluorescent probes for incorporation into degradable polymers, Eur.J.Pharm.Biopharm. (Band 45), Nr. 3, Seite 265-273.

[35] Burt, D. W. und Paton, I. R. (1992): Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta gene family, DNA Cell Biol. (Band 11), Nr. 7, Seite 497-510. URL: PM:1388723

[36] Busch, O.; Solheim, E.; Bang, G. und Tornes, K. (1996): Guided tissue regeneration and local delivery of insulinlike growth factor I by bioerodible polyorthoester membranes in rat calvarial defects, Int J Oral Maxillofac Implants (Band 11), Seite 498-505.

[37] Canalis E (1980): Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria., J Clin Invest (Band 66), Nr. 4, Seite 709-719.

[38] Canalis, E. und Lian, J. B. (1988): Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae, Bone (Band 9), Nr. 4, Seite 243-246. URL: PM:3262362

[39] Canalis, E.; Pash, J. und Varghese, S. (1993): Skeletal growth factors, Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr. (Band 3), Nr. 3, Seite 155-166.

[40] Carpenter, J.; Hipp, J.; Gerhart, T.; Rudmann, C.; Hayes, W. und Trippel, S. (1992): Failure of growth hormone to alter the biomecanics of fracture-healing in a rabbit model, J Bone Joint Surg (Band 74A), Seite 359-367.

[41] Carrington JL; Roberts AB; Flanders KC; Roche NS und Reddi AH (1988): Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development, J Cell Biol (Band 107), Nr. 5, Seite 1969-1975.

[42] Celeste, A. J.; Iannazzi, J. A.; Taylor, R. C.; Hewick, R. M.; Rosen, V.; Wang, E. A. und Wozney, J. M. (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 87), Nr. 24, Seite 9843-9847. URL: PM:2263636

[43] Centrella, M.; McCarthy, T. L. und Canalis, E. (1988): Skeletal tissue and transforming growth factor beta, FASEB J. (Band 2), Nr. 15, Seite 3066-3073.

[44] Centrella, M.; McCarthy, T. L. und Canalis, E. (1989): Effects of transforming growth factors on bone cells, Connect.Tissue Res (Band 20), Nr. 1-4, Seite 267-275. URL: PM:2692955

[45] Centrella, M.; McCarthy, T. L. und Canalis, E. (1991): Transforming growth factor-beta and remodeling of bone, J Bone Joint Surg.Am. (Band 73), Nr. 9, Seite 1418-1428.

[46] Chakkalakal, D. A.; Strates, B. S.; Mashoof, A. A.; Garvin, K. L.; Novak, J. R.; Fritz, E. D.; Mollner, T. J. und McGuire, M. H. (1999): Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing, Bone (Band 25), Nr. 3, Seite 321-332.

[47] Chen, N. T.; Glowacki, J.; Bucky, L. P. und et al (1994): The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in rabbits, Plast Reconstr Surg (Band 93), Seite 714-724.

[48] Chevalley, T.; Strong, D. D.; Mohan, S.; Baylink, D. und Linkhart, T. A. (1996): Evidence for a role for insulin-like growth factor binding proteins in glucocorticoid inhibition of normal human osteoblast-like cell proliferation, Eur.J Endocrinol. (Band 134), Nr. 5, Seite 591-601. URL: PM:8664980

[49] Cho, T. J.; Gerstenfeld, L. C. und Einhorn, T. A. (2002): Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing, J Bone Miner.Res (Band 17), Nr. 3, Seite 513-520. URL: PM:11874242

[50] Claes, L.; Augat, P.; Suger, G. und Wilke, H. J. (1997): Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing, J Orthop.Res (Band 15), Nr. 4, Seite 577-584.

[51] Claeys, Ilse; Simonet, Gert; Poels, Jeroen; Van Loy, Tom; Vercammen, Linda; De Loof, Arnold und Vanden Broeck, Jozef (2002): Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway, Peptides (Band 23), Nr. 4, Seite 807-816. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T0M-459W2CJ-X/1/8d9298b2140206c420ce405c0cd3e588

[52] Coventry, M.; Nolan, D. und Bukenbauch, R. (1973): "Delayed" prophylactic anticoagulation: a study of results and complications in 2,012 total hip arthroplasties., J Bone and Joint Surg (Band 55), Nr. 7, Seite 1487-1492.

[53] Critchlow MA; Bland YS und Ashhurst DE (1995): The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit, Bone (Band 16), Nr. 5, Seite 521-527.

[54] Critchlow, M. A.; Bland, Y. S. und Ashhurst, D. E. (1994): The effects of age on the response of rabbit periosteal osteoprogenitor cells to exogenous transforming growth factor-beta 2, J Cell Sci. (Band 107 (Pt 2)), Seite 499-516. URL: PM:8207075

[55] Daughaday, W. H. und Rotwein, P. (1989): Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations, Endocr.Rev. (Band 10), Nr. 1, Seite 68-91.

[56] Dequeker, J.; Mohan, S.; Finkelman, R. D.; Aerssens, J. und Baylink, D. J. (1993): Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor types I and II and transforming growth factor beta in cortical bone from the iliac crest. Possible mechanism of increased bone density and protection against osteoporosis, Arthritis Rheum. (Band 36), Nr. 12, Seite 1702-1708. URL: PM:8250990

[57] Derynck, R.; Jarrett, J. A.; Chen, E. Y.; Eaton, D. H.; Bell, J. R.; Assoian, R. K.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. und Goeddel, D. V. (1985): Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells, Nature (Band 316), Nr. 6030, Seite 701-705. URL: PM:3861940

[58] Dodds, R. A.; Merry, K.; Littlewood, A. und Gowen, M. (1994): Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage, J Histochem.Cytochem. (Band 42), Nr. 6, Seite 733-744. URL: PM:8189035

[59] Ebeling, P. R.; Jones, J. D.; O'Fallon, W. M.; Janes, C. H. und Riggs, B. L. (1993): Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women., J Clin Endocrinol Metab, Nr. 77(5), Seite 1384-1387.

[60] Edwall, D.; Prisell, P. T.; Levinovitz, A.; Jennische, E. und Norstedt, G. (1992): Expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in regenerating bone after fracture: influence of indomethacin, J Bone Miner Res (Band 7), Nr. 2, Seite 207-213. URL: PM:1570765

[61] Eingartner, C.; Coerper, S.; Fritz, J.; Gaissmaier, C.; Koveker, G. und Weise, K. (1999): Growth factors in distraction osteogenesis. Immuno-histological pattern of TGF-beta1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis, Int.Orthop. (Band 23), Nr. 5, Seite 253-259.

[62] Einhorn, T. A. (1995): Enhancement of fracture healing, J.Bone Joint Surg.Am. (Band 77), Nr. 6, Seite 940-956.

[63] Einhorn, T. A. (1998): The cell and molecular biology of fracture healing, Clin.Orthop., Nr. 355 Suppl, Seite S7-21.

[64] Einhorn, T. A. und Lane, J. M. (1998): Significant advances have been made in the way surgeons treat fractures [editorial], Clin.Orthop., Nr. 355 Suppl, Seite S2-S3.

[65] Einhorn, T. A.; Levine, B. und Michel, P. (1990): Nutrition and bone, Orthop.Clin.North Am. (Band 21), Nr. 1, Seite 43-50.

[66] Einhorn, T. A.; Majeska, R. J.; Rush, E. B.; Levine, P. M. und Horowitz, M. C. (1995): The expression of cytokine activity by fracture callus, J.Bone Miner.Res. (Band 10), Nr. 8, Seite 1272-1281.

[67] Elford, P. R. und Lamberts, S. W. (1990): Contrasting modulation by transforming growth factor-beta-1 of insulin-like growth factor-I production in osteoblasts and chondrocytes, Endocrinology (Band 127), Nr. 4, Seite 1635-1639.

[68] Eriksen, E.; Kassem, M. und Langdahl, B. (1996): Growth hormone, insuline like growth factors and bone remodelling, Europ J Clin Invest (Band 26), Seite 525-534.

[69] Ernst, M. und Froesch, E. R. (1988): Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I, Biochem.Biophys.Res Commun. (Band 151), Nr. 1, Seite 142-147. URL: PM:3348770

[70] Ernst, M. und Rodan, G. (1990): Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presense of growth hormone (GH): positive corellation with the presence of GH-induced IGF-binding protein BP-3, Endocrinology (Band 127), Seite 807-814.

[71] Finkelman, R. D.; Mohan, S.; Jennings, J. C.; Taylor, A. K.; Jepsen, S. und Baylink, D. J. (1990): Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin, J Bone Miner Res (Band 5), Nr. 7, Seite 717-723. URL: PM:2396498

[72] Florini, J. R. und Roberts, S. B. (1979): A serum-free medium for the growth of muscle cells in culture, In Vitro (Band 15), Nr. 12, Seite 983-992. URL: PM:94034

[73] Flyvbjerg, A. (1990): Growth factors and diabetic complications, Diabet.Med. (Band 7), Nr. 5, Seite 387-399.

[74] Frolik, C. A.; Wakefield, L. M.; Smith, D. M. und Sporn, M. B. (1984): Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts, J.Biol.Chem. (Band 259), Nr. 17, Seite 10995-11000.

[75] Frystyk, J.; Skjaerbaek, C.; Dinesen, B. und Oerskov, H. (1994): Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum, FEBS Letters (Band 348), Seite 185-191.

[76] Fujimoto, R.; Tanizawa, T.; Nishida, S.; Yamamoto, N.; Soshi, S.; Endo, N. und Takahashi, H. E. (1999): Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site, J.Bone Miner.Metab. (Band 17), Nr. 1, Seite 11-17.

[77] Garces GL; Garcia-Castellano JM und Nogales J (1997): Longitudinal overgrowth of bone after osteotomy in young rats: influence of bone stability, Calcif Tissue Int (Band 60), Nr. 4, Seite 391-393.

[78] Gerber, H. P und Ferrara, N. (2000): Angiogenesis and bone growth, Trends Cardiovasc Med (Band 10), Seite 223-228.

[79] Glowacki, J. (1998): Angiogenesis in Fracture Repair, Clin.Orthop. (Band 355S), Seite S82-S89 .

[80] Goad, D. L.; Rubin, J.; Wang, H. und et al (1996): Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human Sa-OS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insuline-like growth factor I, Endocrinology (Band 137), Seite 2262-2268.

[81] Gombotz, W. R.; Pankey, S. C. ; Bouchard, L. S.; Ranchalis, J. und Puolakkainen, P. (1993): Controlled release of TGF-beta 1 from a biodegradable matrix for bone regeneration , J Biomater Sci Polym Ed (Band 5), Seite 49-63.

[82] Gopferich, A. (1996): Mechanisms of polymer degradation and erosion, Biomaterials (Band 17), Seite 103-114.

[83] Govender, S.; Csimma, C.; Genant, H. K.; Valentin-Opran, A.; Amit, Y.; Arbel, R.; Aro, H.; Atar, D.; Bishay, M.; Borner, M. G.; Chiron, P.; Choong, P.; Cinats, J.; Courtenay, B.; Feibel, R. ; Geulette, B.; Gravel, C.; Haas, N.; Raschke, M.; Hammacher, E.; van, der, V; Hardy, P.; Holt, M.; Josten, C.; Ketterl, R. L.; Lindeque, B.; Lob, G.; Mathevon, H. ; McCoy, G.; Marsh, D.; Miller, R.; Munting, E.; Oevre, S.; Nordsletten, L.; Patel, A.; Pohl, A.; Rennie, W.; Reynders, P.; Rommens, P. M.; Rondia, J.; Rossouw, W. C.; Daneel, P. J.; Ruff, S.; Ruter, A.; Santavirta, S.; Schildhauer, T. A.; Gekle, C.; Schnettler, R.; Segal, D.; Seiler, H.; Snowdowne, R. B.; Stapert, J.; Taglang, G.; Verdonk, R.; Vogels, L.; Weckbach, A.; Wentzensen, A. und Wisniewski, T. (2002): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients, J Bone Joint Surg Am (Band 84-A), Nr. 12, Seite 2123-2134. URL: PM:12473698

[84] Green, H.; Morikawa, M. und Nixon, T. (1985): A dual effector theory of growth hormone action, Differentiation (Band 29), Seite 195-198.

[85] Gristina, A. G. und Costerton, J. W. (1985): Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis, J Bone Joint Surg Am. (Band 67), Nr. 2, Seite 264-273.

[86] Harada, S.; Rodan, S. B. und Rodan, G. A. (1995): Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts, Clin Orthop (Band 313), Seite 76-80.

[87] Heldin, C. H.; Miyazono, K. und ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, Nature (Band 390), Nr. 6659, Seite 465-471. URL: PM:9393997

[88] Helmke, U. und Becker, T. (1981): [Healing of fractures and soft tissues depending on tissue pressure (animal experiment)], Z.Exp.Chir (Band 14), Nr. 4, Seite 210-217. URL: PM:7281848

[89] Henricson, A.; Hulth, A. und Johnell, O. (1987): The cartilaginous fracture callus in rats, Acta Orthop.Scand. (Band 58), Seite 244-248.

[90] Hill, P.; Reynolds, J. und Meikle, M. (1995): Osteoblast mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function, Endocrinology (Band 136), Seite 124-131.

[91] Hock, J.; Centrella, M. und Canalis, E. (1988): Insulin like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication, Endocrinology (Band 122), Nr. 1, Seite 254-260.

[92] Hoffmann J.E; Schmidmaier G; Duda G.N und Raschke M (1999): Ein neues standardisiertes Frakturmodell an der Ratte., Der Unfallchirurg (Band 281), Seite 275.

[93] Holmes, S. J. und Shalet, S. M. (1996): Role of growth hormone and sex steroids in achieving and maintaining normal bone mass, Horm.Res (Band 45), Nr. 1-2, Seite 86-93. URL: PM:8742125

[94] Isaksson, O.; Jansson, J. und Gause, I. (1982): Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly, Science (Band 216), Seite 1237-1239.

[95] Isgaard, J.; Nilsson, A.; Lindahl, A.; Jansson, J. und Isaksson, O. (1986): Effects of local administration of GH and IGF-I on longitudinal bone growth in rats, Am J Physiol (Band 250), Nr. 4 Pt 1, Seite 367-372.

[96] Jones, J. I. und Clemmons, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions., Endocr Rev (Band 16), Nr. 1, Seite 3-34.

[97] Joyce, M.; Jingushi, S. und Bolander, M. (1990): Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair, Orthop Clin North Am (Band 21), Nr. 1, Seite 199-209.

[98] Joyce, M.; Roberts, A. B.; Sporn, M. und Bolander ME (1990): Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur., J Cell Biol (Band 110), Nr. 6, Seite 2195-2207.

[99] Kandziora F; Pflugmacher R; Scholz M; Schäfer J; Schollmeier G; Schmidmaier G; Duda G; Raschke M und Haas N P (2003): Dose-dependent effects of combined IGF-I and TGF-ß1 application in a sheep cervical spine fusion model., Eur Spine J (Band 12), Nr. 5, Seite 464-473.

[100] Kandziora, F.; Bail, H.; Schmidmaier, G.; Schollmeier, G.; Scholz, M.; Knispel, C.; Hiller, T.; Pflugmacher, R.; Mittlmeier, T.; Raschke, M. und Haas, N. P. (2002): Bone morphogenic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbodycage: in vivo results of a new carrier for growth factors, J Neurosurg (Spine 1) (Band 97), Seite 40-48.

[101] Kandziora, F.; Schmidmaier, G.; Schollmeier, G.; Bail, H. ; Pflugmacher, R.; Gorke, T.; Wagner, M.; Raschke, M.; Mittlmeier, T. und Haas, N. P. (2002): 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 (Band 27), Nr. 16, Seite 1710-1723. URL: PM:12195060

[102] Kasperk CH; Wergedal JE; Mohan S; Long DL; Lau KH und Baylink DJ (1990): Interactions of growth factors present in bone matrix with bone cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase., Growth Factors (Band 3), Nr. 2, Seite 147-158.

[103] Kassem, M.; Mosekilde, L. und Eriksen, E. (1994): Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro, Growth Regul (Band 4), Seite 131-135.

[104] Kawabata, M.; Imamura, T. und Miyazono, K. (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins, Cytokine Growth Factor Rev. (Band 9), Nr. 1, Seite 49-61. URL: PM:9720756

[105] Kehrl, J. H.; Roberts, A. B. ; Wakefield, L. M.; Jakowlew, S. ; Sporn, M. B. und Fauci, A. S. (1986): Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes, J Immunol. (Band 137), Nr. 12, Seite 3855-3860. URL: PM:2878044

[106] Kirker-Head, C. A.; Gerhart, T. N.; Schelling, S. H.; Hennig, G. E.; Wang, E. und Holtrop, M. E. (1995): Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2, Clin.Orthop., Nr. 318, Seite 222-230. URL: PM:7671521

[107] Kramer, M. F.; Kinschert, R. ; Aidonidis, I. und Metz, J. (1998): Occurence of a terminal vasculation after experimental myocardial infarction, Cell Tissue Res (Band 291), Seite 97-105.

[108] Kulkarni, R. K.; Moore, E. G.; Hegyeli, A. F. und Leonard, F. (1971): Biodegradable poly(lactic acid) polymers, J Biomed Mater Res (Band 5), Seite 169-181.

[109] Kulkarni, R. K.; Pani, K. C. ; Neuman, C. und Leonard, F. (1966): Polylactic acid for surgical implants, Arch Surg (Band 93), Seite 839-843.

[110] Laurencin, C. und Lane, J. M. (1994): Poly/(lactic acid) and Poly(glycolic acid):Orthopaedic Surgery Applications, Brighton, C.; Friedlaender, G. und Lane, J. M., Bone Formation and Repair , 1. Auflage, Seite 325-339, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, ISBN: 0-89203-116-6.

[111] Lazowski, D. A.; Fraher, L. J.; Hodsman, A.; Steer, B.; Modrowski, D. und Han, V. K. (1994): Regional variation of insulin-like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage, Bone (Band 15), Nr. 5, Seite 563-576. URL: PM:7980968

[112] Lee, F. Y.; Choi, Y. W.; Behrens, F. F.; DeFouw, D. O. und Einhorn, T. A. (1998): Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing, J.Orthop.Res. (Band 16), Nr. 1, Seite 144-150.

[113] Leung K; Rajkovic IA; Peters E; Markus I; Van Wyk JJ und Ho KK (1996): Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action, Endocrinology (Band 137), Nr. 7, Seite 2694-2702.

[114] Levander G (1938): A study of bone regeneration, Surg Gynecol Obset (Band 67), Seite 705-714.

[115] Li J; Mori S; Kaji Y; Mashiba T; Kawanishi J und Norimatsu H (1999): Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats, J Bone Miner Res (Band 14), Nr. 6, Seite 969- 979.

[116] Li RH und Wozney JM (2001): Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins , Trends Biotechnol (Band 19), Nr. 7, Seite 255-265.

[117] Lian, J. B. und Stein, G. S. (1992): Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation, Crit Rev.Oral Biol.Med. (Band 3), Nr. 3, Seite 269-305. URL: PM:1571474

[118] Lieberman, J. R.; Daluiski, A.; Stevenson, S.; Wu, L.; McAllister, P.; Lee, Y. P.; Kabo, J. M.; Finerman, G. A.; Berk, A. J. und Witte, O. N. (1999): The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats, J Bone Joint Surg.Am. (Band 81), Nr. 7, Seite 905-917.

[119] Lind, M. (1996): Growth factors: possible new clinical tools. A review, Acta Orthop.Scand. (Band 67), Nr. 4, Seite 407-417.

[120] Lind, M. (1998): Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation, Acta Orthop.Scand.Suppl. (Band 283), Nr. Suppl, Seite 2-37.

[121] Lind, M.; Eriksen, E. F. und Bunger, C. (1996): Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells, Bone (Band 18), Nr. 1, Seite 53-57.

[122] Lind, M.; Overgaard, S.; Nguyen, T.; Ongpipattanakul, B.; Bunger, C. und Soballe, K. (1996): Transforming growth factor-beta stimulates bone ongrowth. Hydroxyapatite-coated implants studied in dogs, Acta Orthop.Scand. (Band 67), Nr. 6, Seite 611-616.

[123] Lind, M.; Schumacker, B.; Soballe, K.; Keller, J.; Melsen, F. und Bunger, C. (1993): Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibia, Acta Orthop.Scand. (Band 64), Nr. 5, Seite 553-556.

[124] Linkhart, T. A. und Keffer, M. J. (1991): Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II release from cultured neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, transforming growth factor-beta, and 1,25-dihydroxyvitamin D3, Endocrinology (Band 128), Nr. 3, Seite 1511-1518. URL: PM:1999170

[125] Linkhart, T. A.; Mohan, S. und Baylink, D. J. (1996): Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP, Bone (Band 19), Nr. 1 Suppl , Seite 1S-12S.

[126] Littenberg, B.; Weinstein, L. P.; McCarren, M.; Mead, T.; Swiontkowski, M. F.; Rudicel, S. A. und Heck, D. (1998): Closed fractures of the tibial shaft. A meta-analysis of three methods of treatment, J Bone Joint Surg Am (Band 80), Nr. 2, Seite 174-183. URL: PM:9486723

[127] Lucas, P. A.; Laurencin, C.; Syftestad, G. T.; Domb, A.; Goldberg, V. M.; Caplan, A. I. und Langer, R. (1990): Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a polyanhydride delivery vehicle, J Biomed Mater Res (Band 24), Nr. 7, Seite 901-911. URL: PM:2398077

[128] Lucke M; Schmidmaier G; Sadoni, S; Wildemann B; Schiller R; Haas N und Raschke (2003): Gentamicin Coating of Metallic Implants Reduces Implant Related Osteomyelitis in Rats, Bone (Band 32), Nr. 5, Seite 521-531.

[129] Lucke M; Schmidmaier G; Sadoni, S; Wildemann B; Schiller R; Stemberger A; Haas N und Raschke M (2003): A new model of implant related osteomyelitis in rats, J Biomed.Mater.Res.

[130] Lucke, M; Schmidmaier, G; Sadoni, S; Malzacher, H; Schiller, R und Raschke, M (2003): ANTIBIOTIC COATED INTRAMEDULLARY TITANIUM IMPLANTS IN PROPHYLAXIS OF ACUTE IMPLANT RELATED OSTEOMYELITIS IN RATS, Trans.49.Meeting of Orthop.Res.Soc. (Band 28), Seite 1060.

[131] Ludwig, S. C.; Kowalski, J. M. und Boden, S. D. (2000): Osteoinductive bone graft substitutes, Eur Spine J (Band 9 Suppl), Seite S119-S125.

[132] Lyons, R. M.; Keski-Oja, J. und Moses, H. L. (1988): Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium, J Cell Biol. (Band 106), Nr. 5, Seite 1659-1665. URL: PM:2967299

[133] Madsen, K.; Friberg, U.; Roos, P.; Eden, S. und Isaksson, O. (1983): Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage, Nature (Band 304), Seite 545-547.

[134] Martin TJ (1988): Cell biology in bone, Clin Endocrinol and Metabol , 2nd. Auflage, Seite 1-29, Mackays of Chautham PLC Press, New York.

[135] Massague J (1998): TGF-beta signal transduction., Annu Rev Biochem (Band 67), Seite 753-791.

[136] Massague, J. (1990): The transforming growth factor-beta family, Annu.Rev.Cell Biol. (Band 6), Seite 597-641.

[137] Massague, J. und Like, B. (1985): Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines, J Biol.Chem. (Band 260), Nr. 5, Seite 2636-2645. URL: PM:2982829

[138] Matkovic V (1996): Nutrition, genetics and skeletal development, J Am Coll Nutr (Band 15), Nr. 6, Seite 556-569.

[139] Matsumura T; Whelan MC; Li XQ und Trippel SB (2000): Regulation by IGF-I and TGF-beta1 of Swarm-rat chondrosarcoma chondrocytes., J Orthop Res (Band 18), Nr. 3, Seite 351-355.

[140] McCarthy, T.; Centrella, M. und Canalis, E. (1989): Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures, Endocrinology (Band 124), Seite 301-309.

[141] McCarthy, T. L.; Centrella, M. und Canalis, E. (1989): Insulin-like growth factor (IGF) and bone, Connect.Tissue Res. (Band 20), Nr. 1-4, Seite 277-282.

[142] McCarthy, T. L.; Centrella, M. und Canalis, E. (1992): Constitutive synthesis of insulin-like growth factor-II by primary osteoblast-enriched cultures from fetal rat calvariae, Endocrinology (Band 130), Nr. 3, Seite 1303-1308.

[143] McKibbin B (1978): The biology of fracture healing in long bones, J Bone Joint Surg Br (Band 60), Nr. b(2), Seite 150-162.

[144] Meinig, R. P.; Buesing, C. M.; Helm, J. und Gogolewski, S. (1997): Regeneration of diaphyseal bone defects using resorbable poly(L/DL-lactide) and poly(D-lactide) membranes in the Yucatan pig model, J Orthop Trauma (Band 11), Seite 551-558.

[145] Merriman, H. L.; La Tour, D. ; Linkhart, T. A.; Mohan, S.; Baylink, D. J. und Strong, D. D. (1990): Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce c-fos in mouse osteoblastic cells, Calcif.Tissue Int. (Band 46), Nr. 4, Seite 258-262.

[146] Miyazono, K.; Hellman, U.; Wernstedt, C. und Heldin, C. H. (1988): Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization, J Biol.Chem. (Band 263), Nr. 13, Seite 6407-6415. URL: PM:3162913

[147] Mohan, S. (1993): Insulin-like growth factor binding proteins in bone cell regulation, Growth Regul. (Band 3), Nr. 1 , Seite 67-70.

[148] Mohan, S. und Baylink, D. J. (1991): Bone growth factors, Clin.Orthop. (Band 263), Seite 30-48.

[149] Mohan, S.; Nakao, Y.; Honda, Y.; Landale, E.; Leser, U.; Dony, C.; Lang, K. und Baylink, D. J. (1995): Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells, J.Biol.Chem. (Band 270), Nr. 35, Seite 20424-20431.

[150] Mohan, S.; Strong, D. D.; Lempert, U. G.; Tremollieres, F.; Wergedal, J. E. und Baylink, D. J. (1992): Studies on regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-4 production in human bone cells, Acta Endocrinol.(Copenh) (Band 127), Nr. 6, Seite 555-564. URL: PM:1283479

[151] Muschler, G. F.; Hyodo, A.; Manning, T.; Kambic, H. und Easley, K. (1994): Evaluation of human bone morphogenetic protein 2 in a canine spinal fusion model, Clin.Orthop., Nr. 308, Seite 229-240. URL: PM:7955688

[152] Nakase, T.; Nomura, S.; Yoshikawa, H.; Hashimoto, J.; Hirota, S.; Kitamura, Y.; Oikawa, S.; Ono, K. und Takaoka, K. (1994): Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing, J.Bone Miner.Res. (Band 9), Nr. 5, Seite 651-659.

[153] Nicolas V; Prewett A; Bettica P; Mohan S; Finkelman RD; Baylink DJ und Farley JR (1994): Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging, J Clin Endocrinol Metab (Band 78), Nr. 5, Seite 1011-1016.

[154] Nicolas, V.; Mohan, S.; Honda, Y.; Prewett, A.; Finkelman, R. D.; Baylink, D. J. und Farley, J. R. (1995): An age-related decrease in the concentration of insulin-like growth factor binding protein-5 in human cortical bone, Calcif.Tissue Int. (Band 57), Nr. 3, Seite 206-212. URL: PM:8574938

[155] Nielsen, H. M.; Andreassen, T. T.; Ledet, T. und Oxlund, H. (1994): Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat, Acta Orthop.Scand. (Band 65), Nr. 1, Seite 37-41.

[156] Nielsen, H. M.; Bak, B.; Jorgensen, P. H. und Andreassen, T. T. (1991): Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat, Acta Orthop.Scand. (Band 62), Nr. 3, Seite 244-247.

[157] Nilsson, A.; Carlsson, B.; Isgaard, J.; Isaksson, O. G. und Rymo, L. (1990): Regulation by GH of insulin-like growth factor-I mRNA expression in rat epiphyseal growth plate as studied with in-situ hybridization, J Endocrinol. (Band 125), Nr. 1, Seite 67-74. URL: PM:2187051

[158] Nilsson, A.; Isgaard, J.; Lindahl, A.; Dahlstrom, A.; Skottner, A. und Isaksson, O. G. (1986): Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate, Science (Band 233), Nr. 4763, Seite 571-574. URL: PM:3523759

[159] Nilsson, A.; Isgaard, J.; Lindahl, A.; Peterson, L. und Isaksson, O. (1987): Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats, Calif Tissue Int (Band 40), Seite 91-96.

[160] Noda M und Camilliere JJ (1989): In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta., Endocrinology (Band 124), Nr. 6, Seite 2991-2994.

[161] Ogawa, Y.; Schmidt, D. K.; Nathan, R. M.; Armstrong, R. M.; Miller, K. L.; Sawamura, S. J.; Ziman, J. M.; Erickson, K. L.; de Leon, E. R.; Rosen, D. M. und et, al (1992): Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation, J.Biol.Chem. (Band 267), Nr. 20, Seite 14233-14237.

[162] Okubo Y; Bessho K; Fujimura K; Konishi Y; Kusumoto K; Ogawa Y und Iizuka T (2000): Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites., Int J Oral Maxillofac Surg (Band 29), Nr. 1, Seite 62-66.

[163] Otto TE; Patka P und Haarman HJ (1995): Closed fracture healing: a rat model, Eur Surg Res (Band 27), Nr. 4, Seite 277-284.

[164] Oursler, M. J.; Cortese, C.; Keeting, P.; Anderson, M. A.; Bonde, S. K.; Riggs, B. L. und Spelsberg, T. C. (1991): Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone, Endocrinology (Band 129), Nr. 6, Seite 3313-3320. URL: PM:1954907

[165] Peltoniemi, H. H.; Hallikainen, D.; Toivonen, T.; Helevirta, P. und Waris, T. (1999): SR-PLLA and SR-PGA miniscrews: biodegradation and tissue reactions in the calvarium and dura mater, J.Craniomaxillofac.Surg. (Band 27), Nr. 1, Seite 42-50.

[166] Pfeilschifter, J.; D'Souza, S. M. und Mundy, G. R. (1987): Effects of transforming growth factor-beta on osteoblastic osteosarcoma cells, Endocrinology (Band 121), Nr. 1, Seite 212-218. URL: PM:3474142

[167] Pfeilschifter, J.; Laukhuf, F.; Muller, Beckmann B.; Blum, W. F.; Pfister, T. und Ziegler, R. (1995): Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone, J.Clin.Invest. (Band 96), Nr. 2, Seite 767-774.

[168] Pfeilschifter, J.; Oechsner, M.; Naumann, A.; Gronwald, R. ; Minne, H. und Ziegler, R. (1990): 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 (Band 127), Nr. 1, Seite 69-75.

[169] Pihlajamaki, H.; Bostman, O. ; Hirvensalo, E.; Tormala, P. und Rokkanen, P. (1992): Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies, J Bone Joint Surg Br. (Band 74), Nr. 6, Seite 853-857. URL: PM:1447246

[170] Pinholt, E. M.; Solheim, E.; Bang, G. und Sudmann, E. (1991): Bone induction by composite of bioerodible polyorthoester and demineralized bone matrix in rats, Acta Orthop Scand (Band 62), Nr. 5, Seite 476-480. URL: PM:1835243

[171] Pinholt, E. M.; Solheim, E.; Bang, G. und Sudmann, E. (1992): Bone induction by composites of bioresorbable carriers and demineralized bone in rats: a comparative study of fibrin-collagen paste, fibrin sealant, and polyorthoester with gentamicin, J Oral Maxillofac.Surg (Band 50), Nr. 12, Seite 1300-1304. URL: PM:1447610

[172] Pircher, R.; Jullien, P. und Lawrence, D. A. (1986): Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex, Biochem.Biophys.Res Commun. (Band 136), Nr. 1, Seite 30-37. URL: PM:3458465

[173] Preece MA und Holder AT (1982): The somatomedins: a family of serum growth factors, Recent Advances in Endocrinology and Metabolism (Band 2), Nr. 47.

[174] Prisell, P. T.; Edwall, D.; Lindblad, J. B.; Levinovitz, A. und Norstedt, G. (1993): Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat, Calcif.Tissue Int. (Band 53), Nr. 3, Seite 201-205. URL: PM:8242473

[175] Pritchard, J. und Ruzicka, A. (1950): Comparison of fracture repair in the frog, lizard and rat, J Anat (Band 84), Seite 236-261.

[176] Probst, A.; Jansen, H.; Ladas, A. und Spiegel, H. U. (1999): Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats, J Orthop.Res (Band 17), Nr. 2, Seite 256-260.

[177] Quinlan, T. R.; Li, D.; Laubach, V. E.; Shesely, E. G.; Zhou, N. und Johns, R. A. (2000): eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (Band 279), Seite L641-L650.

[178] Raab-Cullen, D. M.; Thiede, M. A.; Petersen, D. N.; Kimmel, D. B. und Recker, R. R. (1994): Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression, Calcif.Tissue Int. (Band 55), Nr. 6, Seite 473-478. URL: PM:7895187

[179] Raisz, L. G. und Kream, B. E. (1981): Hormonal control of skeletal growth, Annu.Rev.Physiol (Band 43), Seite 225-238. URL: PM:7011182

[180] Raschke M; Kolbeck S; Bail H; Schmidmaier G; Flyvbjerg A; Lindner T; Dahne M; Roenne I und Haas N (2001): Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects, Bone (Band 29), Nr. 4, Seite 368-373.

[181] Raschke M; Wildemann B; Inden P; Bail H; Flyvbjerg A; Hoffmann J; Haas NP und Schmidmaier G (2002): 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 (Band 30), Nr. 1, Seite 144-151.

[182] Raschke, M. J.; Bail, H.; Windhagen, H. J.; Kolbeck, S. F.; Weiler, A.; Raun, K.; Kappelgard, A.; Skiaerbaek, C. und Haas, N. P. (1999): Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis, Bone (Band 24), Nr. 2, Seite 81-88.

[183] Rauch F; Lauzier D; Travers R; Glorieux F und Hamdy R (2000): Effects of locally applied transforming growth factor-beta1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model., Bone (Band 26), Nr. 6, Seite 619-624.

[184] Rinderknecht, E. und Humbel, R. E. (1978): Primary structure of human insulin-like growth factor II, FEBS Lett. (Band 89), Nr. 2, Seite 283-286. URL: PM:658418

[185] Ripamonti U; Duneas N; Van Den Heever B; Bosch C und Crooks J (1997): Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation., J Bone Miner Res (Band 12), Nr. 10, Seite 1584-1595.

[186] Ristow, H. J. (1986): BSC-1 growth inhibitor/type beta transforming growth factor is a strong inhibitor of thymocyte proliferation, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 83), Nr. 15, Seite 5531-5533. URL: PM:3488549

[187] Robey, P. G. und Termine, J. D. (1985): Human bone cells in vitro, Calcif.Tissue Int. (Band 37), Nr. 5, Seite 453-460. URL: PM:2998572

[188] Rokkanen, P.; Bostman, O.; Vainionpaa, S.; Vihtonen, K.; Tormala, P.; Laiho, J.; Kilpikari, J. und Tamminmaki, M. (1985): Biodegradable implants in fracture fixation: early results of treatment of fractures of the ankle, Lancet (Band 1), Nr. 8443, Seite 1422-1424. URL: PM:2861365

[189] Rook, A. H.; Kehrl, J. H.; Wakefield, L. M.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B.; Burlington, D. B. ; Lane, H. C. und Fauci, A. S. (1986): Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness, J Immunol. (Band 136), Nr. 10, Seite 3916-3920. URL: PM:2871107

[190] Rosen, C. J. (1994): Growth hormone, insulin-like growth factors, and the senescent skeleton: Ponce de Leon's Fountain revisited?, J.Cell Biochem. (Band 56), Nr. 3, Seite 348-356.

[191] Rosen, C. J.; Dimai, H. P.; Vereault, D.; Donahue, L. R.; Beamer, W. G.; Farley, J.; Linkhart, S.; Linkhart, T.; Mohan, S. und Baylink, D. J. (1997): Circulating and skeletal insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in two inbred strains of mice with different bone mineral densities, Bone (Band 21), Nr. 3, Seite 217-223.

[192] Rosen, C. J.; Donahue, L. R. und Hunter, S. J. (1994): Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection, Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (Band 206), Nr. 2, Seite 83-102 . URL: PM:8208742

[193] Rosen, D. M.; Stempien, S. A.; Thompson, A. Y. und Seyedin, S. M. (1988): Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro, J.Cell Physiol (Band 134), Nr. 3, Seite 337-346.

[194] Rosier, R. N.; O'Keefe, R. J. und Hicks, D. G. (1998): The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing, Clin.Orthop. (Band 355), Nr. Suppl, Seite S294-S300.

[195] Rüter-A; Trentz-O und Wagner-M (1995): Kompartmentsyndrom , Unfallchirurgie , Seite 18-21, Springer-Verlag, München-Wien-Baltimore.

[196] Saadeh, P. B.; Mehrara, B. J.; Steinbrech, D. S.; Dudziak, M. E.; Greenwald, J. A.; Luchs, J. S.; Spector, J. A.; Ueno, H.; Gittes, G. K. und Longaker, M. T. (1999): Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts, Am.J.Physiol. (Band 277), Nr. 4 Pt 1, Seite C628-C637.

[197] Sakai, R.; Miwa, K. und Eto, Y. (1999): Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model, Bone (Band 25), Nr. 2, Seite 191-196.

[198] Sandberg MM (1991): Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components, Ann Med (Band 23), Nr. 3, Seite 207-217.

[199] Sandberg, M.; Aro, H. und Vuorio, E. (1993): Gene expression during bone repair, Clin Orthop (Band 289), Seite 292-312.

[200] Sandberg, M.; Autio-Harmainen, H. und Vuorio, E. (1988): Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones, Dev.Biol. (Band 130), Nr. 1, Seite 324-334. URL: PM:3053296

[201] Sandberg, M.; Vuorio, T.; Hirvonen, H.; Alitalo, K. und Vuorio, E. (1988): Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones, Development (Band 102), Nr. 3, Seite 461-470. URL: PM:3141126

[202] Sanderson, P. J. (1989): Preventing infection in orthopaedic implants, J Antimicrob.Chemother. (Band 24), Nr. 3, Seite 277-280.

[203] Scheven, B. A. und Hamilton, N. J. (1991): Longitudinal bone growth in vitro: effects of insulin-like growth factor I and growth hormone, Acta Endocrinol.(Copenh) (Band 124), Nr. 5, Seite 602-607. URL: PM:2028719

[204] Schimandle, J. H.; Boden, S. D. und Hutton, W. C. (1995): Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2, Spine (Band 20), Nr. 12, Seite 1326-1337. URL: PM:7676329

[205] Schmid, Christof (1995): Insulin-like growth factors, Cell Biology International (Band 19), Nr. 5, Seite 445-458. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WCB-45NJX89-33/2/6836f769eedb225cb8463050e104c4b2

[206] Schmidmaier G; Wildemann B; Bail H; Lucke M; Fuchs T; Stemberger A; Flyvbjerg A; Haas NP und Raschke M (2001): Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-ß1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats, Bone (Band 28), Nr. 4, Seite 341-350.

[207] Schmidmaier G; Wildemann B; Cromme F; Kandziora F; Haas NP und Raschke M (2002): BMP-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment, Bone (Band 6), Seite 618-622.

[208] Schmidmaier G; Wildemann B; Gäbelein T; Heeger J; Kandziora F; Haas N und Raschke, M (2003): Synergistic effect of IGF-I and TGF-1 on fracture haeling in rats - Single versus combined application of IGF-I and TGF-β1 -, Acta Orthop.Scand. (Band 74), Seite 604-610.

[209] Schmidmaier G; Wildemann B; Lucke M; Stange R; Gäbelein T; Heeger J; Bail H und Raschke M (2001): Insulin like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-ß1 (TGF-ß1) have synergistic effects on fracture healing in rats, Trans.47.Meeting of Orthop.Res.Soc. (Band 26), Seite 102.

[210] Schmidmaier G; Wildemann B; Lübberstedt, M.; Haas N P und Raschke M (2003): IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture, J.Biomed.Mater.Res, Applied Biomat. (Band 65b), Seite 157- 162.

[211] Schmidmaier G; Wildemann B; Melis, B; Krummrey G; Einhorn A.; Haas N und Raschke M (2003): Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat, Eur J Trauma.

[212] Schmidmaier G; Wildemann B; Ostapowicz D; Kandziora F; Stange R; Haas N und Raschke M (2003): Growth factors (IGF-I and TGF-1) enhance fracture healing in early phases without alteration of physiological processes during time course, J Orthop Res.

[213] Schmidmaier G; Wildemann B; Stemberger A; Haas NP und Raschke M (2001): Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors, J.Biomed.Mater.Res, Applied Biomat. (Band 58), Nr. 4, Seite 449-455.

[214] Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Cromme F; Kandziora, F.; Haas, N. P. und Raschke, M. (2002): BMP-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodelling in fracture treatment, Trans.48.Meeting of Orthop.Res.Soc. (Band 27), Seite 0332.

[215] Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Heeger, J.; Gabelein, T.; Flyvbjerg, A.; Bail, H. J. und Raschke, M. (2002): Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-[beta]1, Bone (Band 31), Nr. 1, Seite 165-172. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4Y-45YJB7B-5/1/ed6fc7b54c4e7ca6689ac4b9c76c1d39

[216] Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Ostapowicz, D.; Melis, B. ; Haas, N. P. und Raschke, M. (2003): Time course of unstimulated and growth factor (IGF-I and TGF-β1) stimulated rat tibial healing, Trans.49.Meeting of Orthop.Res.Soc.

[217] Schmitz, J. P. und Hollinger, J. O. (1988): A preliminary study of the osteogenic potential of a biodegradable alloplastic-osteoinductive alloimplant, Clin.Orthop, Nr. 237, Seite 245-255. URL: PM:2847892

[218] Schulze, E.; Witt, M.; Kasper, M.; Lowik, C. W. und Funk, R. H. (1999): Immunohistochemical investigations on the differentiation marker protein E11 in rat calvaria, calvaria cell culture and the osteoblastic cell line ROS 17/2.8, Histochem.Cell Biol. (Band 111), Nr. 1, Seite 61-69.

[219] Sciadini, M. F.; Dawson, J. M. und Johnson, K. D. (1997): Bovine-derived bone protein as a bone graft substitute in a canine segmental defect model, J.Orthop.Trauma (Band 11), Nr. 7, Seite 496-508. URL: PM:9334951

[220] Seyedin, S. M.; Thomas, T. C.; Thompson, A. Y.; Rosen, D. M. und Piez, K. A. (1985): Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 82), Nr. 8, Seite 2267-2271. URL: PM:3857579

[221] Shimasaki S und Ling N (1992): Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs-1, -2, -3, -4, -5 and -6)., Prog in Growth Factor Res (Band 3), Seite 243-266.

[222] Silver, I. A.; Murrills, R. J. und Etherington, D. J. (1988): Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts, Exp.Cell Res (Band 175), Nr. 2, Seite 266 -276. URL: PM:3360056

[223] Skottner A; Arrhenius-Nyberg V; Kanje M und Fryklund L (1990): Anabolic and tissue repair functions of recombinant insulin-like growth factor I., Acta Paediatr Scand Suppl (Band 367), Seite 63-66.

[224] Slootweg, M.; Hoggerbrugge, C.; dePoorter, T.; Duursma, S. und vanBuul-Offers, S. (1990): The presence of classical insulin-like growth factor (IGF) type-I and type-II receptors in mouse osteoblasts: Autocrine/paracrine growth effect of IGFs?, J Endocrinology (Band 125), Nr. 2, Seite 271-277.

[225] Solheim, E. (1998): Growth factors in bone, Int.Orthop. (Band 22), Nr. 6, Seite 410-416.

[226] Sorensen, T. S.; Sorensen, A. I. und Merser, S. (1990): Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads, Acta Orthop.Scand. (Band 61), Nr. 4, Seite 353-356.

[227] Southorn, P. A.; Plevak, D. J.; Wright, A. J. und Wilson, W. R. (1986): Adverse effects of vancomycin administered in the perioperative period, Mayo Clin.Proc. (Band 61), Nr. 9, Seite 721-724.

[228] Spencer EM; Liu CC; Si EC und Howard GA (1991): In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats., Bone (Band 12), Nr. 1, Seite 21-26.

[229] Spencer, E. M.; Si, E. C.; Liu, C. C. und Howard, G. A. (1989): Parathyroid hormone potentiates the effect of insulin-like growth factor-I on bone formation, Acta Endocrinol.(Copenh) (Band 121), Nr. 3, Seite 435-442. URL: PM:2800920

[230] Sporn, M. B. und Roberts, A. B. (1990): TGF-beta: problems and prospects, Cell Regul. (Band 1), Nr. 12, Seite 875-882. URL: PM:2100192

[231] Sporn, M. B.; Roberts, A. B. ; Wakefield, L. M. und de Crombrugghe, B. (1987): Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta, J Cell Biol. (Band 105), Nr. 3, Seite 1039-1045. URL: PM:3308901

[232] Stahelin, A.; Weiler, A.; Rufenacht, H.; Hoffmann, R.; Geissmann, A. und Feinstein, R. (1997): Clinical degradation and biocompatibility of different bioabsorbable interference screws: A report of six cases, Arthroscopy (Band 13), Seite 238-244.

[233] Stange R; Wildemann B; Haas N; Raschke M und Schmidmaier G (2003): Osteogenesis and vascularization during fracture healing are influenced by locally applied IGF-1 and TGF-1, Cell & Tissue Research.

[234] Stange, R; Schmidmaier, G; Wildemann, B; Haas, N P und Raschke, M (2003): Osteogenesis and vascularization of the fracture callus are affected by continuous local application of growth factors IGF-1 and TGF-Beta 1, Trans.49.Meeting of Orthop.Res.Soc. (Band 28), Seite 0483.

[235] Street, J.; Winter, D.; Wang, J. H.; Wakai, A.; McGuiness, A. und Redmond, H. P. (2000): Is Human fracture hematoma inherently angiogenic?, Clin.Orthop. (Band 378), Seite 224-237.

[236] Sumner, D. R.; Turner, T. M. ; Purchio, A. F.; Gombotz, W. R. ; Urban, R. M. und Galante, J. O. (1995): Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta, J.Bone Joint Surg.Am. (Band 77), Nr. 8, Seite 1135-1147.

[237] Suter, F.; Avai, A.; Fusco, U.; Gerundini, M.; Caprioli, S. und Maggiolo, F. (1994): Teicoplanin versus cefamandole in the prevention of infection in total hip replacement, Eur J Clin.Microbiol.Infect.Dis. (Band 13), Nr. 10, Seite 793-796.

[238] Takaoka, K.; Koezuka, M. und Nakahara, H. (1991): Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein, J.Orthop.Res. (Band 9), Nr. 6, Seite 902-907.

[239] Taylor, G. J.; Bannister, G. C. und Calder, S. (1990): Perioperative wound infection in elective orthopaedic surgery [published erratum appears in J Hosp Infect 1991 Feb;17(2):155], J Hosp.Infect. (Band 16), Nr. 3, Seite 241-247.

[240] Terrell, T. G.; Working, P. K.; Chow, C. P. und Green, J. D. (1993): Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits, Int.Rev.Exp.Pathol. (Band 34 Pt B), Seite 43-67.

[241] Thaller SR; Dart A und Tesluk H (1993): The effects of insulin-like growth factor-1 on critical-size calvarial defects in Sprague-Dawley rats., Ann Plast Surg (Band 31), Nr. 5, Seite 429-433.

[242] Thaller, SR.; Hoyt, J.; Tesluk, H. und Holmes, R. (1993): Effect of insulin-like growth factor-1 on zygomatic arch bone rgeneration: A preliminary histological and histometric study, Ann Plast Surg (Band 31), Seite 421-428.

[243] Thaller, SR.; Hoyt, J.; Tesluk, H. und Holmes, R. (1993): The effect of insulin growth factor-1 on calvarial sutures in a Sprague-Dawley rat, J Craniofac Surg (Band 4), Nr. 1, Seite 35-39.

[244] Tielinen, L.; Manninen, M.; Puolakkainen, P.; Pihlajamaki, H.; Pohjonen, T.; Rautavuori, J. und Tormala, P. (1998): Polylactide pin with transforming growth factor beta 1 in delayed osteotomy fixation, Clin.Orthop., Nr. 355, Seite 312-322.

[245] Tobias, J. H.; Chow, J. W. und Chambers, T. J. (1992): Opposite effects of insulin-like growth factor-I on the formation of trabecular and cortical bone in adult female rats, Endocrinology (Band 131), Nr. 5, Seite 2387-2392. URL: PM:1425437

[246] Toblli JE; Stella I; Inserra F; Ferder L; Zeller F und Mazza ON (2000): Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats., Am J Hypertens (Band 13), Nr. 6, Seite 686-692.

[247] Toriumi, D. M.; Kotler, H. S.; Luxenberg, D. P.; Holtrop, M. E. und Wang, E. A. (1991): Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation, Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg. (Band 117), Nr. 10, Seite 1101-1112. URL: PM:1910694

[248] Tremollieres, F. A.; Strong, D. D.; Baylink, D. J. und Mohan, S. (1991): Insulin-like growth factor II and transforming growth factor beta 1 regulate insulin-like growth factor I secretion in mouse bone cells, Acta Endocrinol.(Copenh) (Band 125), Nr. 5, Seite 538-546. URL: PM:1759543

[249] Trippel, S.; Coutts, R.; Einhorn, T.; Mundy, R. und Rosenfeld, R. (1996): Growth factors as therapeutic agents, J Bone Joint Surg (Band 78A), Nr. 8, Seite 1272-1286.

[250] Tsukazaki T; Usa T; Matsumoto T; Enomoto H; Ohtsuru A; Namba H; Iwasaki K und Yamashita S (1994): Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes., Exp Cell Res (Band 215), Nr. 1, Seite 9-16.

[251] Turgeman G; Pittman DD; Muller R; Kurkalli BG; Zhou S; Pelled G; Peyser A; Zilberman Y; Moutsatsos IK und Gazit D (2001): Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy., J Gene Med (Band 3), Nr. 3, Seite 240- 251.

[252] Turner, R. T. und Spelsberg, T. C. (1991): Correlation between mRNA levels for bone cell proteins and bone formation in long bones of maturing rats, Am J Physiol (Band 261), Nr. 3 Pt 1, Seite E348-E353 . URL: PM:1887882

[253] Urist M.R. und McLean F.C. (1941): Calcification and Ossification I. Calcification in the callus in healing fractures in normal rats, J Bone and Joint Surg (Band 23), Nr. 1 , Seite 1-16.

[254] Urist MR (1965): Bone: formation by autoinduction, Science (Band 150), Nr. 698, Seite 893-899.

[255] Urist, M. R.; Nilsson, O.; Rasmussen, J.; Hirota, W.; Lovell, T.; Schmalzreid, T. und Finerman, G. A. (1987): Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs, Clin.Orthop, Nr. 214, Seite 295-304. URL: PM:3791755

[256] van den Eijnden-van Raaij AJ; Koornneef, I. und van Zoelen, E. J. (1988): A new method for high yield purification of type beta transforming growth factor from human platelets, Biochem.Biophys.Res Commun. (Band 157), Nr. 1, Seite 16-23. URL: PM:3196328

[257] Vannereau, H.; Teot, L. und Pous, J. G. (1985): [Arrangement of collagen fibers in the epiphyses and metaphyses of long bones in vertebrates], C R Acad Sci III (Band 301), Nr. 16, Seite 721-726.

[258] Vasconez, O.; Martinez, V.; Martinez, A. L.; Hidalgo, F.; Diamond, F. B.; Rosenbloom, A. L.; Rosenfeld, R. G. und Guevara-Aguirre, J. (1994): Heart rate increases in patients with growth hormone receptor deficiency treated with insulin-like growth factor I, Acta Paediatr.Suppl (Band 399), Seite 137-139. URL: PM:7949599

[259] Wahl, S. M.; Hunt, D. A.; Wakefield, L. M.; McCartney-Francis, N.; Wahl, L. M.; Roberts, A. B. und Sporn, M. B. (1987): Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 84), Nr. 16, Seite 5788-5792. URL: PM:2886992

[260] Wakefield, L. M.; Smith, D. M.; Flanders, K. C. und Sporn, M. B. (1988): Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences, J Biol.Chem. (Band 263), Nr. 16, Seite 7646-7654. URL: PM:3163692

[261] Wall, R.; Klenerman, L.; McCullough, C. und Fyfe, I. (1988): A comparison of teicoplanin and cefuroxime as prophylaxis for orthopaedic implant surgery: a preliminary report, J Antimicrob.Chemother. (Band 21 Suppl A), Seite 141-146.

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

[263] Weiler, A.; Windhagen, H.; Raschke, M.; Laumeyer, A. und Hoffmann, R. (1998): Biodegradable interference screw fixation exhibits pull-out force and stiffness similar to titanium screws, Am J Sports Med (Band 26), Seite 119-128.

[264] Welch, R. D.; Jones, A. L.; Bucholz, R. W.; Reinert, C. M.; Tjia, J. S.; Pierce, W. A.; Wozney, J. M. und Li, X. J. (1998): Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model, J.Bone Miner.Res. (Band 13), Nr. 9, Seite 1483-1490.

[265] Wergedal, J. E.; Mohan, S.; Lundy, M. und Baylink, D. J. (1990): Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells, J Bone Miner Res (Band 5), Nr. 2, Seite 179-186. URL: PM:2156409

[266] Wildemann B; Schmidmaier G; Brenner, N.; Hüning, M.; Stange R; Haas N und Raschke M (2004): Quantification, localization and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor stimulated fracture healing, Calif Tissue Int.

[267] Wildemann, B.; Schmidmaier, G.; Brenner, N.; Haas, N. P. und Raschke, M. (2002): Quantification and Immunohistochemical detection of IGF-I and TGF-beta1 during the early phase of fracture healing, Trans.48.Meeting of Orthop.Res.Soc. (Band 27), Seite 0704.

[268] Wildemann, B.; Schmidmaier, G.; Ordel, S.; Stange, R.; Haas, N. P. und Raschke, M. (2003): Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-1: Comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU, J Biomed Mater Res (Band 65B), Nr. 1, Seite 150-156.

[269] Wilton, P. (1992): Treatment with recombinant human insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome)., Acta Paediatr.Suppl. (Band 383), Seite 137-142.

[270] Wood, M. J. (1996): The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin [see comments] [published erratum appears in J Antimicrob Chemother 1996 Nov;38(5):919 and 1997 Jul;40(1):147], J Antimicrob.Chemother. (Band 37), Nr. 2, Seite 209-222.

[271] Wozney JM; Rosen V; Celeste AJ; Mitsock LM; Whitters MJ; Kriz RW; Hewick RM und Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities., Science (Band 242), Nr. 4885, Seite 1528-1534.

[272] Wozney, J. M. (1993): Bone morphogenetic proteins and their gene expression, Noda M, Cellular and molecular biology of bone , Seite 131-167, Academic Press, Tokyo.

[273] Yasko, A. W.; Lane, J. M.; Fellinger, E. J.; Rosen, V.; Wozney, J. M. und Wang, E. A. (1992): The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats, J.Bone Joint Surg.Am. (Band 74), Nr. 5, Seite 659-670.

[274] Yeh, J. K.; Aloia, J. F.; Chen, M.; Ling, N.; Koo, H. C. und Millard, W. J. (1994): Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats, Am J Physiol (Band 266), Seite E129-E135.

[275] Yoshida K; Bessho K; Fujimura K; Ogawa Y; Tani Y und Iizuka T (1998): Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study, J Craniomaxillofac Surg (Band 26), Nr. 2, Seite 112-115.

[276] Yu, Y.; Yang, J. L.; Chapman-Sheath, P. J. und Walsh, W. R. (2002): TGF-beta, BMPS, and their signal transducing mediators, Smads, in rat fracture healing, J Biomed.Mater.Res (Band 60), Nr. 3, Seite 392-397. URL: PM:11920662

[277] Zegzula, H. D.; Buck, D. C.; Brekke, J.; Wozney, J. M. und Hollinger, J. O. (1997): Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2), J Bone Joint Surg Am (Band 79), Seite 1778-1790.

[278] Zheng, M. H.; Wood, D. J. und Papadimitriou, J. M. (1992): What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation?, Pathol.Res Pract. (Band 188), Nr. 8, Seite 1104-1121.

Verzeichnis relevanter Abkürzungen

α–SMA	Alpha-smooth muscle actin
ALS	Acid Labile Subunit
BMD	Bone mineral density
BMP	Bone morphogenetic protein
BMU	Basic muticellular unit
BP	Bindungsprotein
DNA	Desoxyribonucleic acid
FGF	Fibroblast growth factor
GDF	Growth-differentiation factor
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
GHRH	Growth hormone releasing hormone
HA	Hydroxylapatit
IGF	Insulin-like growth factor
kD	Kilo-Dalton
mRNA	Messenger ribonucleic acid
OP	Osteogenic protein
PDGF	Platelet derived growth factor
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
PG	Prostaglandin
Pges	Gesamt-Proteinkonzentration
PLA	Polylaktid
r	Rekombinant
R	Rezeptor
SIH	Somatostatin
TGF-β	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelian growth factor
WF	Wachstumsfaktor

Danksagung

Zunächst gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert P. Haas, Direktor der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, in dessen Einrichtungen ich die experimentellen Untersuchungen durchführen durfte. Ich danke ihm besonders für die Unterstützung, das Vertrauen und vor allem für die gewährten zeitlichen Freiräume.

Ferner gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Michael Raschke, leitender Oberarzt der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, der mir als Freund stets mit gutem Rat und voller Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung aller Studien zur Seite stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Britt Wildemann, für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der experimentellen Untersuchungen, die maßgeblich für den Erfolg der durchgeführten Arbeiten verantwortlich ist.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Stemberger (München), der mich bereits im Rahmen meiner Promotion unterstützte und mir bei allen Fragen im Rahmen der Entwicklung der Beschichtungstechnologie stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ferner gilt mein Dank und meine Anerkennung meinem gesamten Forschungsteam und allen ehemaligen und noch tätigen Doktoranden und Diplomanden, Frau Karen Baehr, Herrn Peyman Bamdad, Herrn Axel Baumgartner, Frau Niki Brenner, Herrn Felix Cromme, Herrn Dr. Thomas Fuchs, Herrn Tobias Gäbelein, Frau Bärbel Geisen, Frau Christine Haebler, Frau Dr. Joanna Heeger, Herrn Christoph Holmer, Herrn Philipp Inden, Frau Maria Jasper, Frau Anke Kadow-Rumacker, Herrn Moritz Kapp, Hernn Martin Kretschmar, Frau Henrike Kuhn, Herrn Mar Lübberstedt, Frau Heidrun Malzacher, Herrn Björn Melis, Frau Svenja Mohr, Herrn Sebastian Ordel, Herrn Daniel Ostapowicz, Frau Natalie Palasdies, Frau Steffanie Quandte, Herrn Sebastian Sadoni, Herrn Andre Sander, Frau Constanze Schneider, Herrn Philipp Schwabe, Herrn Nikolai Spranger, Herrn Dr. Richard Stange, Herrn Carsten Surke und Herrn Jörg Weber, für die Unmengen an Zeit und die Leidenschaft, die sie in die Durchführung der experimentellen Untersuchungen investiert haben.

Danken möchte ich ebenso allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, insbesondere bei Herrn Dr. Martin Lucke, Herrn Dr. Herman-J. Bail, Herrn Dr. Frank Kandziora, Herrn PD Dr. Andreas Weiler, Herrn Dr. Klaus Schaser und Herrn Dr. Gert Krummrey für die geleistete Unterstützung.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung sowie unserer Forschungsabteilung, insbesondere Frau Gabriele Hardung, Frau Camilla Bergmann, Frau Marzena Princ**,** Herrn Dipl. Ing. Jan-H. Hoffmann und Herrn Prof. Dr. Ing. Georg Duda für die jederzeit gewährte tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung der Versuche.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die Forschungskommission der Charité, die Berliner Sparkassenstiftung Medizin, die Firma BoneMaster (Dresden), die Firma Knoll AG (Ludwigshafen), die Firma Fa. Sanofi-Synthelabo GmbH (Berlin) und die Firma Synthes/Stratec (USA) wäre die Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Dr. med. Gerhard Schmidmaier

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

28.05.2003 Dr. med. Gerhard Schmidmaier