

Aus dem **Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie**  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Norbert P. Haas

**Untersuchung zellulärer Prozesse während der durch  
Wachstumsfaktoren beeinflussten und unbeeinflussten  
Frakturheilung**

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
experimentelle Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
der Charité-Universitätsmedizin Berlin

von  
Dr. rer. nat. Britt Wildemann  
geboren am 30.09.1969 in Itzehoe

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Paul

Präsidenten: Univ.-Prof. Dr. D. Lenzen, Univ.-Prof. Dr. J. Mlyneck

Eingereicht: April 2004

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. B. Vollmar  
Univ.-Prof. Dr. med. F. Jakob

## Abstrakt

Im Verlauf der Knochenbildung und Frakturheilung kommt es zu einem Zusammenwirken verschiedener Zell- und Gewebearten. Die beteiligten Zellen unterliegen dabei der Regulation von Wachstumsfaktoren (WF), Zytokinen und Hormonen, die den regelhaften Ablauf kontrollieren und steuernd in Proliferation und Differenzierung von Zellen und deren Matrixsynthese eingreifen.

Neben einer optimalen Osteosynthese zur Frakturstabilisation stellt die biologische Beeinflussung der Knochenheilung ein großes Forschungsfeld dar.

In Vorarbeiten wurde ein Applikationssystem entwickelt, das mittels einer biodegradierbaren Polymerbeschichtung auf Osteosynthesematerialien die lokale Applikation von WF in biologisch aktiver Form ermöglicht. *In vivo* wurde an Ratten- und Schweinemodellen erfolgreich die Stimulation der Knochenheilung durch lokal applizierte Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 gezeigt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung zellulärer Prozesse während der beeinflussten und unbeeinflussten Knochenheilung sowie des Effektes der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten Osteosyntheseplatten. Anhand histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen, der *in situ* Hybridisierung an Knochenschnitten und der ELISA-Methode konnte ein früherer Reifungsbeginn des Kallus durch die Wachstumsfaktorenapplikation gezeigt werden, ohne dass es zu Veränderungen der physiologischen Gewebszusammensetzung und der endogenen Wachstumsfaktoren-Expression kam.

Durch Zellkulturstudien an primären Osteoblasten und Osteoklasten wurde an isolierten Zelltypen die Wirkung der applizierten WF untersucht und ihr Effekt auf die Zelltypen dargestellt.

Die Bildung ektooper Ossifikation im Weichgewebe durch die Wachstumsfaktoren wurde im Schafsmodell ausgeschlossen. Dies stellt einen wichtigen Sicherheitsaspekt beim Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Knochenheilung dar.

Die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren von einer Plattenosteosynthese zur Osteotomiestabilisierung im Rattenmodell zeigte eine signifikante Verbesserung der biomechanischen Stabilität und der Kallusheilung 42 Tage nach Osteotomie

Die aus diesen Studien gewonnenen Erkenntnisse liefern Aufschluss zur Weiterentwicklung biologischer Einflussmöglichkeiten auf den Knochenstoffwechsel und die Rolle von WF während der Frakturheilung.

## Abstract

In the process of bone formation and healing, different cell- and tissue types are formed. The cells involved are regulated by growth factors (GF), cytokines and hormones, which control the healing and affect the proliferation and differentiation of cells and their matrix synthesis.

Besides the use of the optimal osteosynthesis for fracture stabilization, the biological influence of the bone healing represents a large research field. In previous work an application system for local application of GF in biologically active form was developed. *In vivo* studies revealed a stimulating effect of locally applied IGF-I and TGF- $\beta$ 1 in a rat and a pig model.

Goal of this work was the investigation of cellular processes during the influenced and uninfluenced bone healing. A further aim was the transfer of the local application method to further stabilization systems (plate osteosynthesis). On the basis of the histology, the immunohistology, in situ hybridizing and ELISA methods an earlier beginning of maturing of the callus by the growth factors could be shown, without changes of the physiological callus composition and the endogenous growth factors expression. In further cell culture studies on primary osteoblasts and osteoclasts the effect of the applied growth factors was examined and their effect on the cell types analyzed. The avoidance of ectopic ossification, an important safety aspect with the use of growth factors to stimulate bone healing, was investigated in a sheep model. It was also possible to proof the efficacy of locally applied growth factors delivered extramedullary from plates.

The results of these studies provide further explanations for the action of the used growth factors and are necessary for the ongoing development of the application of growth factors for a clinical use.

### Schlagwörter:

Frakturheilung, zelluläre Prozesse, Wachstumsfaktoren, Rattenmodell, Zellkultur, Osteoblasten, Osteoklasten

### Keywords:

Fracture healing, cellular processes, growth factors, rat model, cell culture, osteoblasts, osteoclasts

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Wachstumsfaktoren .....	7
1.2	Phasen der Frakturheilung .....	9
1.3	Knochenstruktur .....	12
1.4	Vorarbeiten .....	14
1.5	Wissenschaftliche Fragestellung .....	18
<b>2</b>	<b>Experimentelle Studien</b> .....	<b>19</b>
2.1	Untersuchung der Frühphase der Heilung .....	22
2.1.1	Gewebzusammensetzung und Proliferation .....	22
2.1.2	Quantifizierung der Wachstumsfaktoren .....	23
2.2	Zellkulturuntersuchung .....	24
2.2.1	Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Osteoblasten .....	24
2.2.2	Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Osteoklasten .....	25
2.3	Effekt der Wachstumsfaktoren auf Weichgewebe .....	27
2.4	Lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten Platten ...	28
<b>3</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b> .....	<b>29</b>
3.1	Untersuchung der Frühphase der Knochenheilung .....	30
3.2	Einfluss auf Osteoblasten und Osteoklasten in vitro .....	32
3.3	Effekt der Wachstumsfaktoren auf Weichgewebe .....	33
3.4	Untersuchung der Osteotomieheilung .....	35
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>36</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACS	Absorbable Collagen Sponge
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
BrdU	Bromodeoxyuridine
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
IGF	Insulin-like Growth Factor
KD	Kilo Dalton
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MRNA	messenger Ribonucleic Acid
OP	Osteogenic Protein
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDLLA	Poly(D,L-Laktid)
Pges	Gesamt-Proteinkonzentration
RANK	Receptor Activator NF. B
RANKL	Receptor Activator NF. B Ligand
Rh	rekombinant human
TRAP	Tartrat Resistant Acid Phosphatase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
VEGF	Vascular Endothelia Growth Factor
WF	Wachstumsfaktor

## **1 Einleitung**

Trotz der Eigenschaft des Knochens nach Verletzung seine ursprüngliche Struktur und Eigenschaften ohne minderwertiges Narbengewebe wiederherzustellen, zeigen klinische Erfahrungen, dass es bei der Behandlung von Frakturen zu Komplikationen kommen kann. Komplexe Frakturen mit ausgedehnten Defekten der Knochenstruktur, reduzierte und verzögerte Frakturheilung, Pseudarthrosen und Infektionen sind trotz ständigen Fortschritts ein Problem in der Unfallchirurgie und orthopädischer Chirurgie. Neben den durch das Trauma und die Operation möglicherweise auftretenden Problemen wie Blutverlust, Infektionen, Verletzung von Gefäßen und Nerven, Kompartmentsyndrom, bleibender Funktionsverlust u.a., korrelieren eine Vielzahl von Komplikationen direkt mit der Behandlungsdauer. Bei Patienten mit Frakturen der langen Röhrenknochen können bedingt durch die lange Immobilisation proximale tiefe Beinvenenthrombosen auftreten. Bis zu 5% dieser Patienten versterben an einer Lungenembolie. Zusätzlich kommt es bei 5–25% der Fälle zu einer verzögerten Frakturheilung oder einer Pseudarthrosenbildung. Neben den gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Patienten stellen die Komplikationen ein erhebliches sozioökonomisches Problem dar.

Diese Heilungsstörungen sind zum einen durch mechanische Faktoren wie zum Beispiel Fehlbelastungen bedingt, zum anderen sind komplexe biologische Faktoren wie mangelnde Gefäßeinsprossung und Weichteilschäden, mit konsekutiv verzögerter Heilung der Fraktur ursächlich beteiligt [16,26,38,63].

Gegenstand derzeitiger Forschung ist daher der Einsatz heilungsstimulierender Substanzen, zum Beispiel Wachstumshormon, Parathormon und verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Tabelle 1). Eine vielversprechende Methode stellt die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von einer biodegradierbaren Implantatbeschichtung dar.

## 1.1 Wachstumsfaktoren

Zu den bedeutendsten und am besten untersuchten Wachstumsfaktoren zählen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die Insulin-like Growth Factors (IGFs), die Transforming Growth Factor Betas (TGF $\beta$ s), die Fibroblast Growth Factors (FGFs) und die Platelet-derived Growth Factors (PDGFs). Sie wirken auf lokaler Ebene an der Regulation von Knochenwachstum, -stoffwechsel, -regeneration und -induktion mit.

**Tabelle 1:** Die Rolle verschiedener Wachstumsfaktoren während der Frakturheilung

WF	Quelle, Lokalisation und Wirkung
TGF- $\beta$ 1	Von Thrombozyten und Entzündungszellen in das Frakturhämatom freigesetzt. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts. In proliferierenden mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und der Matrix. In mesenchymalen Zellen, jungen und reifen Chondrozyten. In der Umgebung hypertropher Chondrozyten und in Chondrozyten am Rand der Ossifikationszone.
IGF-I	Wird lokal und in der Leber nach Stimulation mit Wachstumshormon produziert. In proliferierenden Osteoblasten und Osteoklasten. In jungen Chondroblasten am Rand des durch Knorpel ersetzten fibrösen Gewebes. In Endothelzellen von Gefäßen.
BMP-2/4	In mesenchymalen Zellen des Hämatoms und der Kambiumschicht des Periosts im Frakturbereich. In den geflechtknochenaufbauenden Osteoblasten. Nimmt mit zunehmender Knochenmasse ab. In Vorläuferzellen, kurz vor deren Reifung zu Chondrozyten.
PDGF	Von Thrombozyten und Entzündungszellen in das Frakturhämatom freigesetzt. Am 2. Tag nach der Fraktur in Makrophagen lokalisiert, ab dem 3. Tag abnehmend. Stimuliert die Proliferation mesenchymaler Zellen der Kambiumschicht des Periosts. Von Thrombozyten freigesetzt. Stimuliert die intramembranöse Ossifikation.
aFGF	In Zellen der Kambiumschicht, assoziiert mit einer Zunahme mesenchymaler Zellen. Gebildet durch Chondrozyten, ihren Vorläufern und Makrophagen. Stimuliert die Chondrozytenproliferation und -reifung.
bFGF	Möglicherweise von Chondrozyten gebildet. Wichtig für die enchondrale Ossifikation.

Die Tabelle stellt die Ergebnisse verschiedener Arbeiten zusammen. Modifiziert nach Solheim [95]

IGF-I, auch als Somatomedin C bekannt, vermittelt über die GH-IGF-I-Achse einen Teil der Wirkung des hypophysären Wachstumshormons (Growth Hormone, GH). *In vitro*-Versuche belegen den stimulierenden Effekt von IGF-I auf an der Frakturheilung beteiligte Zellen wie Chondrozyten [101], Osteoblasten [23,40,59,87] und Osteoklasten [68].

Die Wirkung von IGF-I *in vivo* wurde in unterschiedlichen tierexperimentellen Versuchsansätzen untersucht. Durch exogen appliziertes GH wurde indirekt die IGF-I-Konzentration erhöht. Während in einigen Versuchen unter Verwendung von nicht speziesspezifischem Wachstumshormon keine Verbesserung der Knochenheilung nachgewiesen werden konnte [6], belegen viele Studien einen positiven Effekt von rekombinant-speziesspezifischem GH [10,11,85,94] auf Knochenbildung oder Frakturheilung. Ebenso zeigte sich ein positiver Effekt durch die direkte Applikation von IGF-I auf die Knochenheilung in verschiedenen Modellen [41,72,98,99]. Im klinischen Einsatz ist die systemische Applikation von IGF-I zur Therapie von Kindern mit Wachstumsstörungen aufgrund einer Wachstumsfaktoren-Rezeptordefizienz (Laron syndrome) [105].

TGF- $\beta$ 1 greift in die Zelldifferenzierung ein und reguliert verschiedene an der Frakturheilung beteiligte Zelltypen wie Mesenchymzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten. Die Wirkung auf die Knochenbildung ist dosisabhängig und kann sowohl aktivierend [59,67] als auch hemmend sein [73,81]. *In vivo*-Versuche zeigten eine deutliche stimulierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Frakturheilung [60,71].

Eine denkbare Erklärung für widersprüchliche Versuchsergebnisse zu den Wirkungen von IGF-I und TGF- $\beta$  könnte in den Unterschieden der genannten Studien, wie der Spezies, Zellart, Zellreife, Zelldichte, Frakturmodell, Dosis, Spezifität des Wirkstoffes oder Applikation liegen [62]. Aus den oben genannten Studien geht jedoch deutlich hervor, dass IGF-I und TGF- $\beta$ 1 als Wirkstoffe geeignet sind, Knochenheilung zu stimulieren.

Eine weitere wichtige Wachstumsfaktorengruppe stellen die BMPs dar. Sie gehören ebenfalls zur TGF- $\beta$  Superfamilie. Ihre osteoinduktive Wirkung wurde in zahlreichen tierexperimentellen Studien gezeigt [12,21,32,89,107]. Die ersten in der orthopädischen Chirurgie zugelassenen Wachstumsfaktoren sind das BMP-2 (rhBMP-



2/ACS, Wyeth, USA) und das BMP-7 (OP-1, Stryker Biotech, USA). Eine prospektive, kontrollierte, randomisierte Studie mit 450 Patienten konnte den positiven Effekt von rhBMP-2 (1,5mg/ml, Wyeth, USA) mit einer verbesserten Heilung, Reduktion sekundärer Eingriffe und der Infektrate zeigen [35]. Die hohe osteoinduktive Potenz von BMP kann jedoch zu unerwünschten ektopen Ossifikationen in nicht-skelettalem Gewebe führen [70,76,106].

## 1.2 Phasen der Frakturheilung

Da die Frakturheilung von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, die ihre Wirkung in unterschiedlichen Phasen der Heilung und während verschiedener zelluläre Prozesse entfalten, ist es notwendig, die zugrundeliegenden zellulären Prozesse näher zu untersuchen.

Die Knochenheilung kann in folgende zwei Arten unterteilt werden:

*Primäre Heilung:* es kommt zu einem direkten Zusammenwachsen der Frakturrenden mit Wiederherstellung der Haverschen Kanäle. Dies erfolgt nur bei einem direkten Kontakt der Frakturrenden.

*Sekundäre Heilung:* im Frakturspalt kommt es zur Ausbildung eines knorpeligen Gewebes, welches analog zur embryonalen Knochenbildung im weiteren Heilungsverlauf verknöchert. Diese Heilungsform findet sich stets bei dem Vorhandensein eines Frakturspalts.

Im klinischem Alltag kommt vorwiegend die sekundäre Heilung vor. Diese soll daher im Folgenden näher erläutert werden.

Die sekundäre Frakturheilung kann in fünf Stadien eingeteilt werden, die teilweise parallel ablaufen (Abb. 1) [31]:

- Hämatombildung und inflammatorische Phase
- Chondrogenese
- Intramembranöse Ossifikation
- Enchondrale Ossifikation
- Remodelling

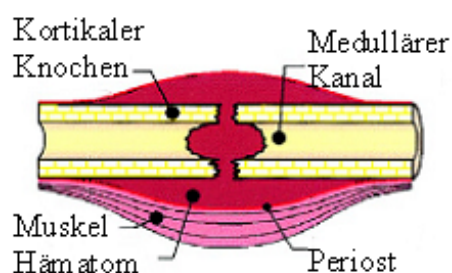
Durch die Verletzung wird die Kontinuität des Knochens zerstört, gegebenenfalls mit begleitendem Weichteiltrauma sowie Verletzung oder Zerstörung von Sehnen, Nerven

und Gefäßen. Es kommt zu entzündlichen Reaktionen und der Bildung eines Hämatoms mit lokaler Infiltration von u. a. Granulozyten, Monozyten und Mastzellen. Die Mastzellen führen über Histamin- und Heparinfreisetzung zu einer Entzündungsreaktion. Im Frakturhämatom finden sich des weiteren pluripotente Stammzellen, die zu Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten ausdifferenzieren. In das Hämatom sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren fördern die Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung. In der hypervaskularisierten Entzündungsphase wird das Frakturhämatom lokal phagozytiert. In der Phase der intramembranösen Ossifikation bildet sich ausgehend vom Periost diaphysär Osteoid. Mesenchymale pluripotente Stammzellen im Periost differenzieren zu Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten und Osteoblasten und beginnen, in Entfernung vom Frakturspalt, Geflechtknochen zu bilden. Fibroblasten und Osteoblasten bilden Kollagene, vor allem Kollagen Typ I. Zwischen den Kollagenfibrillen lagern sich Mineraldepots ab (Hydroxylapatit).

In Abhängigkeit der Stabilität und der Gefäßversorgung bildet sich in der Chondrogenese hyaliner Knorpel. Bei einem Mangel an beidem wird verstärkt Knorpel gebildet [86]. Im Anschluss wird der gebildete Knorpel von proximal und distal der Fraktur einwachsendem Geflechtknochen ersetzt. Diese Phase der enchondralen Ossifikation ist gekennzeichnet durch den vollständigen Durchbau des Frakturkallus mit trabekulärem Knochen.

Abschließend kommt es zum Remodelling des Kallus. Knochenbildung und -resorption führen zu einer Rückbildung überschüssigen Gewebes und zum Ersatz des Geflechtknochens durch lamellären Knochen mit entsprechender Gefäßversorgung [3] [53].

### Inflammatorische Phase



### Enchondrale Ossifikation

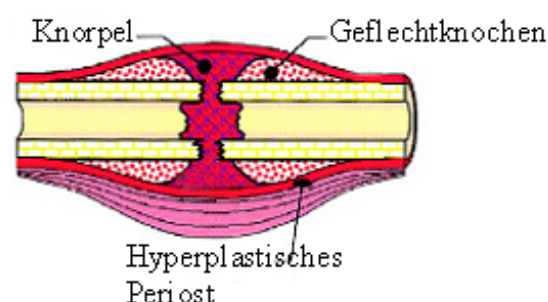


Abb. 1: Gewebszusammensetzung während der Heilung (Modifiziert nach Li 2001)

Für die experimentelle Untersuchung der Frakturheilung hat sich die Ratte als Versuchstier etabliert [1,8,19,55,103]. Neben der Untersuchung der physiologischen Heilung [4,91,104,108] sind in der Literatur auch zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung von Wachstumshormon und verschiedenen Wachstumsfaktoren am Rattenmodell beschrieben [5,7,9,17,88,89]. Daher soll im folgenden auf die Chronologie der Knochenheilung in der Ratte näher eingegangen werden.

Die zeitliche Abfolge kann wie folgt bei der Frakturheilung der Ratte eingeteilt werden: Der **Tag 5** nach der Fraktur ist bei der Ratte durch das Abklingen der inflammatorischen Phase und die Induktion der Chondrogenese gekennzeichnet. Der **Tag 10** repräsentiert das Maximum der Chondrogenese. **15 Tage** nach der Fraktur beginnt die Verknöcherung der Knorpelinseln (enchondrale Ossifikation) und der Umbau des neugebildeten Geflechtknochens. Parallel zu den genannten Phasen findet die intramembranöse Ossifikation statt (Abb. 2) [37]. Anfangs erfolgt diese subperiostal abseits des Frakturspaltes.

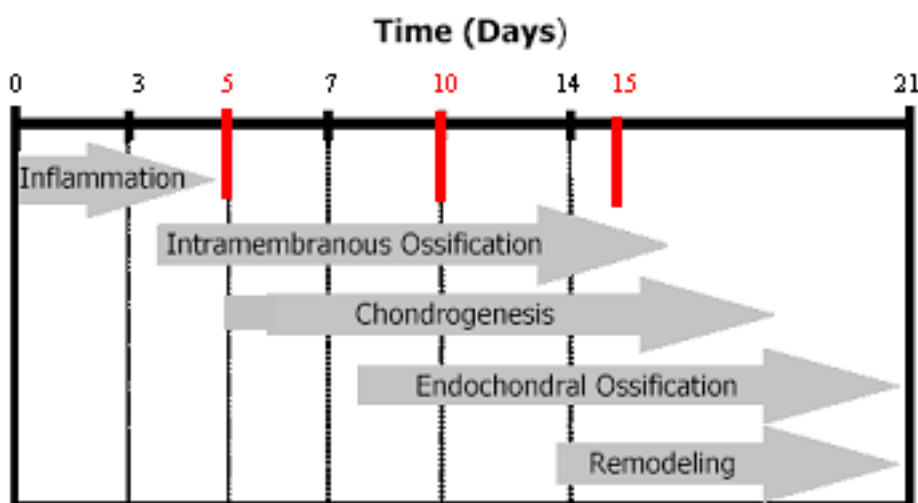


Abb. 2: Zeitliche Abfolge der Heilungsphasen und Untersuchungszeitpunkte (Modifiziert nach Hadjiargyrou 2002)

Eigene Arbeiten

zeigten ein fast abgeschlossenes Kallusremodelling 84 Tage nach der Fraktur im Rattenmodell [91]. Es war kein Knorpel mehr im Kallus vorhanden und die Kallusfläche war reduziert. Im weiteren Verlauf wird der noch vorhandene Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut (Remodelling).

Die Phasen der Heilung sind vergleichbar zwischen Mensch und Ratte vergleichbar, wobei der Heilungsverlauf bei der Ratte schneller erfolgt.

### 1.3 Knochenstruktur

Aufgebaut ist der Knochen aus der Substantia compacta, welche die Markhöhle der Röhrenknochen umgibt, der Substantia corticalis, welche die Oberfläche der Epiphyse bildet, und der Substantia spongiosa, die sich im Knocheninneren befindet.

Auch der gesunde Knochen ist kein statisches Gewebe, sondern unterliegt dem ständigen Auf- und Abbau durch ein gerichtetes Zusammenspiel von knochenaufbauenden und -abbauenden Zellen [78] (Abb.3).

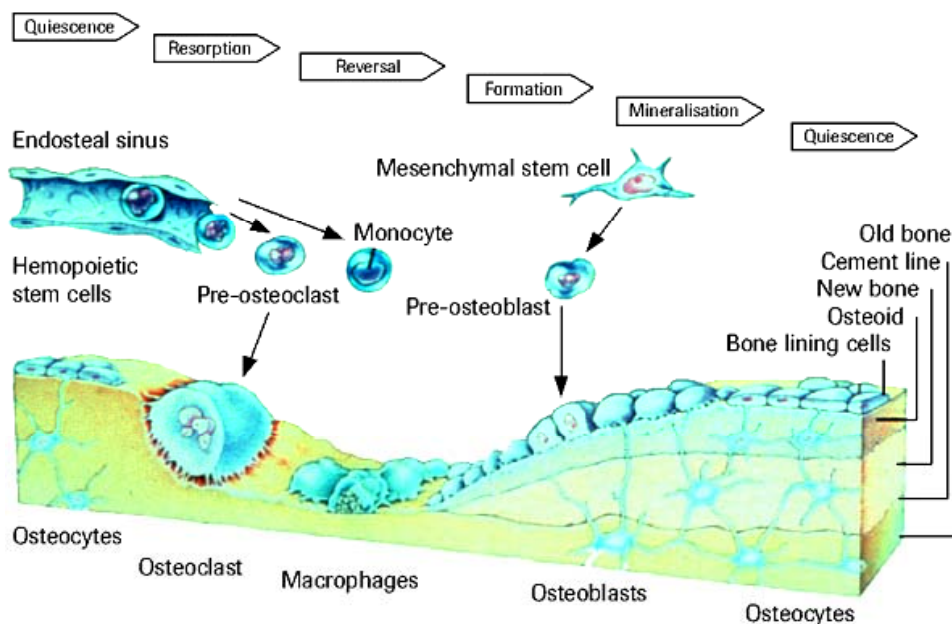


Abb. 3: Schematische Darstellung des Knochenzell-metabolismus ([www.roche.com](http://www.roche.com))

Frost beschrieb 1966 den zeitlichen und anatomischen Zusammenhang zwischen Knochenresorption und -formation und nannte diese funktionelle Einheit „Basic Metabolic Unit“ (später auf „Basic Multicellular Units“ umbenannt BMU) [34].

Der Knochen ist aus folgenden vier verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt [65]:  
Bone lining cells, Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten

Osteoblasten, Osteozyten und Bone lining Cells stammen von lokalen Osteoprogenitorzellen mesenchymaler Herkunft ab.

Bone lining Cells weisen eine sehr hohe Proliferationsrate auf und liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche und in den Havers-Kanälen.

Lichtmikroskopisch stellen sich diese spindelförmig dar, besitzen nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen wenig ausgeprägten Golgi-Komplex.

Bei den Osteoblasten handelt es sich um Zellen, die Bestandteile der Knochengrundsubstanz (Kollagen, Proteoglycane, Glycoproteine) synthetisieren und deren Mineralisation regulieren. Sie befinden sich an der Oberfläche der Knochenbälkchen und liegen dort vergleichbar mit einem einschichtigen Epithel zusammen und stehen über feine zytoplasmatische Fortsätze in Verbindung. Histologisch stellen sie sich basophil dar und weisen alle Anzeichen aktiver, proteinbildender Zellen auf. Sie produzieren Typ-I-Kollagen und sezernieren alkalische Phosphatase. Die neugebildete, noch nicht verkalkte Grundsubstanz, die von den Osteoblasten abgegeben wird, bezeichnet man als Osteoid. Aktive Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1µm breiten Osteoidsaum, von dem innerhalb von drei bis vier Tagen 70% verkalken. Der Rest mineralisiert innerhalb der nächsten sechs Wochen [65].

Der Osteozyt ist ein reifer Osteoblast, der vollständig von Knochengrundsubstanz umgeben ist. Osteozyten sind über feine filopodienartige Fortsätze, die sich in freien Knochenkanälchen befinden und radiär von den Osteozyten liegen, verbunden. Gap Junctions gewährleisten den Fluss von Ionen und kleinen Molekülen über eine Strecke von bis zu 15 Zellen.

Osteoklasten entstehen durch die Fusion mononukleärer Zellen, die aus hämatopoetischem Gewebe stammen. Es sind große, stark verzweigte und bewegliche Riesenzellen, die Knochengrundsubstanz abbauen. Sie weisen histologisch einen sehr großen azidophilen Zelleib mit bis zu 50 Zellkernen auf und wölben sich meist über die Oberfläche der Knochenbälkchen. An Stellen der Knochenresorption liegen Osteoklasten in Einbuchtungen, die als Howship-Lakunen bezeichnet werden. Sie besitzen unter anderem saure Hydrolasen (tartratresistente saure Phosphatasen) als Enzym.

Osteoblasten, reife Osteozyten und Osteoklasten stehen in engem Zusammenhang und sind für das Modelling und Remodelling der Knochenmasse und die trabekuläre Mikroarchitektur verantwortlich [65].

#### 1.4 Vorarbeiten

Der Knochenmetabolismus wird während der Entwicklung, Erhaltung und Heilung durch oben beschriebene Wachstumsfaktoren beeinflusst. Die exogene Gabe der Faktoren soll die Knochenheilung beschleunigen. Jedoch ist zur Stimulation der Knochenheilung durch Wachstumsfaktoren ein geeignetes Applikationssystem notwendig. Für den klinischen Einsatz muss ein Applikationssystem folgende Kriterien erfüllen:

- es muss biokompatibel sein
- es muss eine adäquate Freisetzungskinetik aufweisen
- es darf nicht mit den Heilungsprozessen interferieren
- es sollte keine weiteren Eingriffe nötig machen

Die Arbeitsgruppe hat ein Applikationssystem für die lokale und kontrollierte Anwendung von Wachstumsfaktoren entwickelt. Es handelt sich hierbei um einen „Drug carrier“ auf der Basis eines Poly(D,L-Laktids).

#### ***Eine neue bioaktive Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Implantaten zur kontinuierlichen Freisetzung von Wachstumsfaktoren (IGF-I und TGF- $\beta$ 1)***

Unter kalten Bedingungen lassen sich metallische Implantate mit einer lackartigen, ca. 10  $\mu$ m dünnen, Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung überziehen und sensible Substanzen wie Proteine stabil einarbeiten. Somit fungiert das beschichtete Osteosynthesematerial als Stabilisationssystem und gleichzeitig als lokaler Wirkstoffträger. Vorarbeiten haben eine hohe mechanische Festigkeit der PDLLA-Beschichtung auf Implantaten gezeigt. Während der Implantation und anschließenden Explantation in Rattentibiae und humane Femura kam es zu einem Abrieb von lediglich 5% der Polymerbeschichtung. REM-Untersuchungen der explantierten K-Drähte zeigten, dass es zu keinem kompletten Abrieb der Beschichtung bis auf die Metalloberfläche kommt. Elutionsversuche zeigten eine initiale Freisetzung von 54% IGF-I und 48% TGF- $\beta$ 1 in den ersten 48 Stunden. Im weiteren Verlauf wurden ca. 76% IGF-I und 71% TGF- $\beta$ 1 kontinuierlich über sechs Wochen gelöst. Es kam zu einer Reduktion des Polylaktids um 10% in neun Wochen. Die mikrobiologischen Untersuchungen bestätigten die Sterilität der Beschichtung. Die Adhäsion von Mikroorganismen wurde durch die Beschichtung mit PDLLA signifikant reduziert.

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2001 J Biomedical Materials Research 58:449-455)[93]*

**Die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung am Rattenmodell**

An einem Rattenmodell wurde der Effekt der PDLLA-Beschichtung und der eingearbeiteten Wachstumsfaktoren IGF-I & TGF- $\beta$ 1 auf die Frakturheilung untersucht. Eine Fraktur der rechten Tibia von Ratten wurde mit beschichteten versus unbeschichteten Titan-Kirschner-Drähten stabilisiert. Es folgten radiologische Verlaufsuntersuchungen und die Analyse von Serumparametern. Das Körpergewicht und die Körpertemperatur wurden gemessen, um unerwünschte systemische Wirkungen zu erfassen. Nach 28, 42 und 84 Tagen wurden die Knochen biomechanisch torsional getestet sowie histologisch und histomorphometrisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten in der mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppe 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 fortgeschrittenes Remodelling im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die PDLLA-Beschichtung alleine, ohne eingearbeitete Wachstumsfaktoren, zeigte bereits einen positiven Effekt auf die Frakturheilung. Bei den Serumparametern, dem systemischen IGF-I und dessen Bindungsproteine sowie dem Körpergewicht und der Körpertemperatur ergaben sich keine Unterschiede in den Gruppen. Die Untersuchungen belegen, dass die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 aus einer biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung von Implantaten die Frakturheilung signifikant beschleunigt, wobei keine unerwünschten Wirkungen beobachtet werden konnten. Die Analysen nach 84 Tagen zeigten eine vergleichbare biomechanische Stabilität in allen drei Versuchsgruppen. Die histologische Untersuchung ergab eine vollständige knöcherne Überbrückung der Frakturen und ein fortgeschrittenes Kallusremodelling in allen drei Versuchsgruppen.

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2001 Bone 28(4):341-350) [88]*

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. JOR 2004 in press) [92]*

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2000 Hans-Liniger Preis 2000 der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie)*

***Beschleunigung der Frakturheilung im Großtiermodell durch bioaktive Poly(D,L-Laktid)-Implantate mit kontinuierlicher Freisetzung von Wachstumsfaktoren (IGF-I und TGF- $\beta$ 1)***

Die Untersuchungen im Großtiermodell belegen übereinstimmend mit den biomechanischen und histologischen Kleintierversuchen, dass eine Beschichtung von PDLLA + IGF-I + TGF- $\beta$ 1 die Frakturheilung signifikant beschleunigt. PDLLA ohne eingearbeitete Wachstumsfaktoren zeigte einen leicht stimulierenden Effekt. Die Analyse systemischer Parameter zeigte keine systemischen Nebenwirkungen der lokal applizierten Wachstumsfaktoren.

*(Raschke M, Wildemann B et al. 2002 Bone 30:144-151) [84]*

***Die Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 haben einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung***

Im Kleintiermodell wurde die Wirkung der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 einzeln und in Kombination vergleichend getestet. Die lokale Applikation der Einzelfaktoren IGF-I oder TGF- $\beta$ 1 führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Frakturheilung, gemessen anhand der biomechanischen Torsionsstabilität und der Kalluszusammensetzung. Die kombinierte Gabe der Faktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zeigte hierbei einen synergistischen Effekt.

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2003 Acta.Orthop. Scand. 74:604-610) [90]*

***Der Einfluss lokal applizierter Wachstumsfaktoren (IGF-I und TGF- $\beta$ 1) im Vergleich zur systemischen Applikation vom Wachstumshormon (GH) auf die Frakturheilung im Rattenmodell***

Sowohl die lokale Applikation von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 als auch die systemische Gabe von GH führten zu einer signifikanten Beschleunigung der Frakturheilung. Durch die zusätzliche GH-Applikation unter lokaler Freisetzung von Wachstumsfaktoren ließen sich die Heilungsabläufe jedoch nicht weiter stimulieren.

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2002 Bone 31:165-172) [94]*

***Die lokale Freisetzung von BMP-2 aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung im Rattenmodell***

Die Untersuchung eines weiteren frakturheilungsrelevanten Wachstumsfaktors zeigte, dass die lokale Applikation von BMP-2 aus einer PDLLA-Beschichtung von



Implantaten zu einer signifikant erhöhten biomechanischen Stabilität und zu beschleunigtem Remodelling im Frakturmodell der Ratte führte.

*(Schmidmaier G, Wildemann B et al. 2002 Bone 30:816-822) [89], (Schmidmaier et al. 2002 New Investigator Recognition Award Orthopaedic Research Society)*

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse aus den biomechanischen, radiologischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen 28, 42 und 84 Tagen nach der Fraktur und der Kenntnisstand aus der Literatur lassen vermuten, dass vor allem die frühen Zeitpunkte der Frakturheilung entscheidend durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden können.

## 1.5 Wissenschaftliche Fragestellung

Die bisherigen Versuche der Arbeitsgruppe untersuchten in erster Linie den Effekt der Wachstumsfaktorenapplikation auf die histologische Kalluszusammensetzung und die biomechanische Stabilität zu späteren Zeitpunkten. Ungeklärt sind die Prozesse, die in der frühen Kallusbildung durch die lokale Wachstumsfaktorengabe beeinflusst werden. Zum Verständnis der Wirkungsweise und zur Weiterentwicklung des Einsatzes von Wachstumsfaktoren ist jedoch das Wissen über die zellulären Prozesse von entscheidender Bedeutung.

Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen, die durch *in vivo*- und *in vitro*-Studien untersucht werden sollten:

1. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsfaktoren auf die zellulären Prozesse während der frühen Heilungsphasen
2. Quantifizierung und Lokalisation der Wachstumsfaktoren während der physiologischen und der durch Wachstumsfaktoren beeinflussten Heilung
3. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsfaktoren auf isolierte Zellen in der Zellkultur:
  - Effekt auf Osteoblasten
  - Effekt auf Osteoklasten
4. Untersuchung der Wachstumsfaktoren auf mögliche Induktion ektooper Ossifikation
5. Weiterentwicklung der Beschichtungsmethode: Lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von einer Osteosyntheseplatte

## 2 Experimentelle Studien

### Abriss der eingesetzten Methoden

Den in den Vorarbeiten eingesetzten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 kommt eine bedeutende Rolle während der Frakturheilung zu [13]. Obwohl Wachstumsfaktoren (WF) aufgrund ihrer Wirkung als Regulatoren des Knochenstoffwechsels [25],[50],[59],[62], bei der enchondralen Ossifikation [13,24], bei der Zunahme des Knochengewebes während des Wachstums [66] und der Knochenheilung [14],[57,60,98], große Aufmerksamkeit geschenkt wird, sind die Kenntnisse bezüglich ihrer zellspezifischen Wirkungen während der Frakturheilung noch unzureichend. Die beschleunigte Frakturheilung, die mit dem Einsatz der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 *in vivo* erreicht wurde [84,88], warf die Frage nach den noch weitgehend unklaren Wirkungsmechanismen der WF in der Frühphase der Ossifikation auf. Auch ist die Ursache des beobachteten positiven Effekts der Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung auf die beteiligten Zelltypen noch nicht geklärt. Ergänzend zu qualitativen und semiquantitativen Studien sollten mit *in vitro*-Versuchen an Osteoblasten und Osteoklasten die Wirkung der Wachstumsfaktoren und der Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung untersucht werden.

### Frakturmodell

Das in diesem Projekt verwendete standardisierte Frakturmodell an der Ratte (weibliche Sprague Dawley, 5 Monate alt) ist seit langem in der Arbeitsgruppe etabliert [88]. Unter standardisierten Bedingungen wurde eine geschlossene Fraktur der rechten Tibia und Fibula erzeugt. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt und die Frakturen wie folgt mit Titan-Kirschner-Drähten ( $\varnothing$ : 1mm) stabilisiert:

- I Implantat unbeschichtet
- II Implantat beschichtet mit PDLLA
- III Implantat beschichtet mit PDLLA + rh-IGF-I (50 $\mu$ g) + rh-TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g)

Die Entnahme der Tibia zur weiteren Aufarbeitung erfolgte 5, 10 und 15 Tage nach der Fraktur.

### Osteotomiemodell

Unter standardisierten Bedingungen wurde das Rattenfemur osteotomiert (0,6 mm Spalt) und mit einer Titan-4-Loch-Platte stabilisiert. In Anlehnung an das Frakturmodell wurden die Platten mit gleicher Wachstumsfaktorenkonzentration beschichtet.

- I Platte unbeschichtet
- II Platte beschichtet mit PDLLA
- III Platte beschichtet mit PDLLA + rh-IGF-I (50 $\mu$ g) + rh-TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g)

Die Entnahme der Femura zur biomechanischen Testung und histologischen Aufarbeitung erfolgte 42 Tage nach Osteotomie.

## Zellkultur

### Primäre humane osteoblastenartige Zellen

Osteoblastenartige Zellen wurden durch enzymatischen Aufschluss aus dem vitalen trabekulären Knochengewebe gewonnen (Abb. 4a). Die Charakterisierung erfolgte durch Nachweis der alkalischen Phosphatase-Aktivität, Mineralisationseigenschaften und auf Grund ihrer Morphologie.

### Primäre humane osteoklastenartige Zellen

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherenvenösem Blut erfolgte durch Zentrifugation mit Hilfe eines Dichtegradienten. Die so gewonnenen Zellen ließen sich durch Kultivierung in Gegenwart von *Receptor Activator NF. B Ligand* (RANKL) und *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) zur Fusion und Ausbildung von Osteoklasten anregen. Die Charakterisierung der so erhaltenen Osteoklasten erfolgte anhand ihrer Morphologie und durch Färbung der osteoklastenspezifischen tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) mit Fast Red Violet (Abb. 4b). Die Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten wurde durch Anfärbung der Resorptionslakunen auf Elfenbein-Chips mit Toluidin-Blau-Lösung nachgewiesen (pit formation assay).

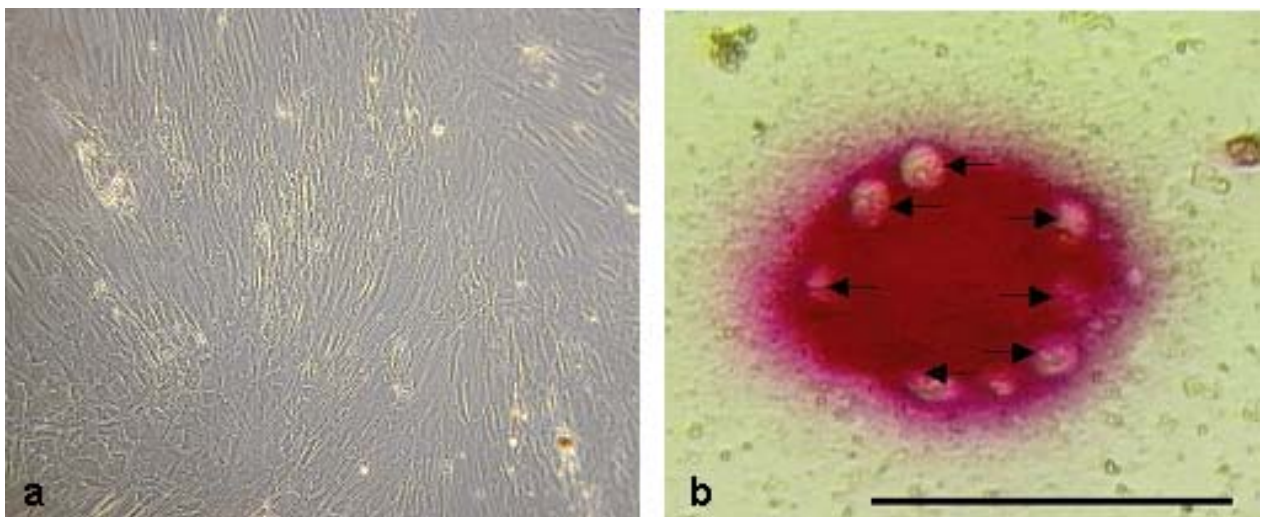


Abb. 4:

- a) Osteoblasten isoliert aus humanem Knochengewebe kultiviert für 10 Tage.
- b) Osteoklast fusioniert aus Monozyten und gefärbt mit TRAP, scale bar: 65µm.

## 2.1 Untersuchung der Frühphase der Heilung

Die histologische und immunhistologische Untersuchung der Frühphase der Frakturheilung sollte Aufschluss über Veränderungen in der Kallusmorphologie, Zellproliferation und -differenzierung geben. Zusätzliches Augenmerk wurde auf die Expression verschiedener Proteine wie Wachstumsfaktoren und deren Genexpression und eine mögliche Fremdkörperreaktion gelegt.

Für die Untersuchung der zugrunde liegenden zellulären Mechanismen wurden die Zeitpunkte 5, 10 und 15 Tage nach Fraktur gewählt.

### 2.1.1 Gewebzusammensetzung und Proliferation

Anhand histologischer Analysen wurde die Kallusmorphologie zu den verschiedenen Zeitpunkten und in den drei Versuchsgruppen untersucht. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf der Zusammensetzung des Frakturkallus. Die oben beschriebenen Phasen der Frakturheilung sind durch ihre Gewebzusammensetzung und mögliche Umbauprozesse gekennzeichnet. Veränderungen dieser Zusammensetzungen und Phasen sollten Rückschlüsse auf die Wirkung der Wachstumsfaktoren ermöglichen.

Neben der histologischen Betrachtung wurde anhand zwei verschiedener immunhistologischer Methoden die Zellproliferation während der normalen Heilung beurteilt und eine geeignete Nachweismethode etabliert. Im zweiten Schritt erfolgte die Untersuchung der beeinflussten Frakturheilung im Vergleich zur unbeeinflussten.

**Wildemann B**, Schmidmaier G, Ordell S, Stange R, Haas NP, Raschke M

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. *J Biomed Mater Res.* 2003, 65B(1):150-156.

### 2.1.2 Quantifizierung der Wachstumsfaktoren

Vor der Quantifizierung von Proteinen im Knochen stand die Etablierung einer geeigneten Methode zur Aufarbeitung mineralisierten Gewebes. Anschließend wurden frakturassoziierte Konzentrationsschwankungen der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 während der Frühphase der Frakturheilung mittels ELISA quantifiziert. Die gemessene Wachstumsfaktorkonzentration konnte dann mit dem Knochengewicht korreliert werden. Des Weiteren wurde durch die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration eine weitere Bezugsgröße ermittelt.

Anhand der Kontrollgruppe mit unbeschichtetem Implantat wurde die Quantität der Wachstumsfaktoren während der Heilung bestimmt. In der Gruppe mit kombinierter Wachstumsfaktorgabe konnten auf die Kontrollgruppe beziehend die möglichen Veränderungen analysiert werden. Interessant war hierbei, inwiefern sich die endogene Freisetzung und Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren durch die lokale Applikation beeinflussen lässt.

Neben der Quantifizierung der Wachstumsfaktoren war auch deren zelluläre Expression von Interesse. Daher wurden im Folgenden die Genexpression und Proteinlokalisierung der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 im Kallus zu den verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

**Wildemann B**, Schmidmaier G, Brenner N, Hüning M, Stange R, Haas NP, Raschke M Quantification, localization and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor stimulated fracture healing. *Calcified Tissue International* 2004, 74:388-397

## 2.2 Zellkulturuntersuchung

Die *in vivo*-Untersuchungen ermöglichen nicht die Analyse des Effekts der Wachstumsfaktoren auf einzelne Zelltypen aufgrund des komplexen Zusammenspiels verschiedener Gewebetypen, Zellarten und systemischer Faktoren, die sich gegenseitig beeinflussen. Daher bietet die Untersuchung an isolierten Zellen unter Kulturbedingungen hier eine Alternative. Durch die Isolierung und Kultivierung von Primärzelltypen können diese in einem geschlossenen System unter definierten Bedingungen untersucht werden. Somit ist es möglich, den Effekt von Substanzen auf individuelle Zelltypen zu analysieren. Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von Wachstumsfaktoren wurden zwei knochenspezifische Zelltypen verwendet: Osteoblasten, die für den Knochenaufbau notwendig sind und Osteoklasten, die Knochen resorbieren.

### 2.2.1 Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Osteoblasten

In dieser Studie sollten zwei Fragen untersucht werden:

1) Welchen Effekt haben die eingesetzten Wachstumsfaktoren auf osteoblastenartige Zellen?

2) Wie lange bleiben die Wachstumsfaktoren in der Polymerbeschichtung aktiv?

Diese Frage stellt einen wichtigen Aspekt beim Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Klinik dar.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zu Kulturen primärer osteoblastenartiger Zellen unterschiedlich lange gelagerte Implantatbeschichtungen (5 und 14 Monate) gegeben und der Effekt der Beschichtung und der Wachstumsfaktoren analysiert.

**Wildemann B**, Lübberstedt M, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G

IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long term storage, Cell culture studies on Primary human osteoblast like cells *Biomaterials* 2004, 25:3639-3644



### 2.2.2 Wirkung von Wachstumsfaktoren auf Osteoklasten

Da neben den knochenaufbauenden Osteoblasten auch die knochenresorbierenden Osteoklasten bei der Knochenheilung eine bedeutende Rolle spielen, sollten diese in der Zellkultur untersucht werden. Vorläuferzellen von Osteoklasten können aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gewonnen werden. Diese Zellen lassen sich durch Kultivierung in Gegenwart von *Receptor Activator NF. B Ligand* (RANKL) und *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) zur Fusion und Ausbildung von Osteoklasten anregen. Der Einfluss der Beschichtung und der Wachstumsfaktoren wurde anhand der Fusions- und Resorptionseigenschaften der Osteoklasten untersucht.

**Wildemann, B.**, Lübberstedt M., Kadow-Romacker A., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G. Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors and a Polylactide Carrier *Transactions of the Orthopaedic Research Society 50<sup>th</sup> Meeting 2004, San Francisco USA*

## DIFFERENCES IN THE FUSION AND RESORPTION ACTIVITY OF HUMAN OSTEOCLASTS AFTER STIMULATION WITH DIFFERENT GROWTH FACTORS AND A POLYLACTIDE CARRIER

+Wildemann, B., Lübberstedt, M., Kadow-Romacker, A., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G.  
Dept. of Trauma and Reconstructive Surgery, Charité, Campus Virchow, Berlin, Germany

### Introduction

Previous *in vivo* studies were able to demonstrate the efficacy of locally released growth factors from a poly(D,L-lactide) implant coating on fracture healing in rat and pig. These studies revealed, that the poly(D,L-lactide) (PDLLA) has also a stimulating effect on the bone healing [Schmidmaier et al. Bone 2001]. *In vitro* studies showed an enhanced osteoblast differentiation after growth factor application [Schmidmaier et al. J. Biomed Mater Res B 2003].

However less is known about the effect of growth factors and application systems on further fracture associated cell types like osteoclasts. *In vitro* studies using human osteoclasts like cells derived from monocyte/macrophage haematopoietic lineage were performed investigating the influence of different growth factors and polylactide on fusion and resorption activity.

### Material and Methods

#### Groups:

Titanium k-wires were coated with poly(D,L-lactide) (30 kDa) and incorporated growth factors. Following groups were investigated:

1. control culture
2. PDLLA coated wires
3. PDLLA and IGF-1 (30µg) & TGF-β1 (6µg) coated wires
4. PDLLA and BMP-2 (30µg) coated wires

#### Cultures:

Mononucleated cells ( $3 \times 10^6$  cells  $\text{cm}^2$ ) were isolated from human peripheral blood. The cells were seeded in 24 well plates and cultured with  $\alpha$ -MEM plus glutamine. For stimulation of osteoclastogenesis RANKL and M-CSF were added. The wires were added to the cultures in a non-contact method. All test were done in triplicate.

#### Fusion-test:

To analyze the effect of the different groups on the fusion behavior of the cells, the cultures were incubated for 14 days, stained for TRAP and the polynucleated stained cells were counted.

#### Resorption-test:

The cells were seeded on dentin-chips (elephant ivory) for 14 days. Thereafter, the wires were added to the cultures and incubated for further 14 days. The resorption lacunae on the dentin were stained with Toluidin blue and counted under the microscope.

### Results

The morphology of the cells (control culture) changed over the observation time. At the beginning only round mononuclear cells were detectable with an equal distribution in the wells. After 7 days cluster formation was detectable and the first fused cells were visible after 9 days in culture. Large cells with several nuclei were seen after 13 days. These cells were positive for the osteoclast specific enzymatic TRAP stain (Fig. 1)

The cultures with the PDLLA wires revealed only few fused and TRAP positive cells (\* $p < 0.05$  ANOVA to control).

The cultures with IGF-1 & TGF-β1 showed a comparable behavior as the control group (Fig. 2). The cell count revealed a reduced amount of formed osteoclasts after BMP-2 treatment, however this effect was not significant.



Fig. 1. TRAP-stain control PDLLA

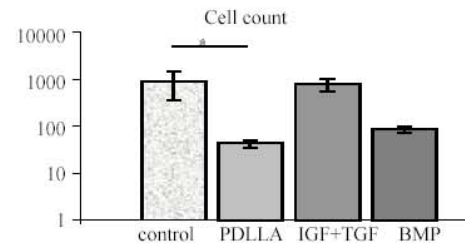


Fig. 2. Fusion-test

A high resorption activity was measurable in the control and the BMP-2 cultures and less in the IGF-1 & TGF-β1 cultures. On all dentin chips resorption lacunae and resorption traces were detectable (Fig. 3). The dentin chips cultured with the PDLLA wires revealed significantly (\* $p < 0.05$  ANOVA) less lacunae (Fig. 4).

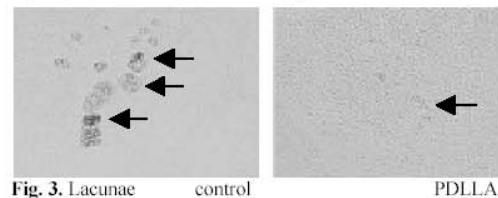


Fig. 3. Lacunae control PDLLA

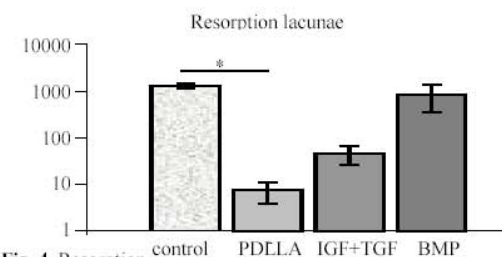


Fig. 4. Resorption

### Discussion

This study examines the effect of a polylactide and growth factors on osteoclasts *in vitro*. The poly(D,L-lactide), used as a local drug carrier *in vivo*, inhibits osteoclast formation and resorption activity *in vitro*. The *in vitro* inhibiting effects of the PDLLA were abolished by the additional application of IGF-1 & TGF-β1 or BMP-2. The application of IGF-1 and TGF-β1 rescued the PDLLA effect on the fusion behavior of the cells but not on the resorption activity of the fused osteoclasts. The application of BMP-2 showed the opposite effect. These observations might indicate an effect of the growth factors depending on the differentiation stage of the cells. Combining the *in vitro* studies on osteoblasts and osteoclasts might explain the *in vivo* [Schmidmaier et al. Bone 2001, 2002] results:

The inhibiting effect of the PDLLA on osteoclasts lead to a stimulation of fracture healing.

This effect was differentiation depending abolished by the growth factors, however due to the stimulation of osteoblastic differentiation the healing was also stimulated.

### Acknowledgement

We would like to thank Dr. M. Amling, University of Hamburg, for his help with the osteoclast cell culture.

### **2.3 Effekt der Wachstumsfaktoren auf Weichgewebe**

In verschiedenen Tiermodellen wurde durch die Gabe von BMP-2 die ektope Knochenbildung induziert. Dies stellt für die klinische Anwendung von Wachstumsfaktoren zur Beeinflussung der Knochenheilung ein Risiko dar. Das Ziel der Studie war daher, die Untersuchung der möglichen ektope Ossifikation aufgrund der lokal aus der PDLLA-Beschichtung freigesetzten Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Da bisherige Studien primär an Mäusen und Ratten erfolgten, die Wirkung in dieser Studie jedoch an einer dem Menschen näher verwandten Tierspezies erfolgen sollte, wurden unterschiedlich beschichtete Implantate in die Muskulatur von Schafen eingebracht und nach einer Standzeit von 84 Tagen auf mögliche Ossifikation untersucht.

**Wildemann B**, Kandziora F, Krummrey G, Palaschies N, Haas NP, Raschke M and Schmidmaier G

Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants do not lead to ectopic bone formation in sheep muscle

*Journal of Controlled Release* 2004, 95:249-256

## 2.4 Lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von beschichteten Platten

Die vorherigen Studien zeigten einen Einfluss der lokal applizierten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die frühe Phase der Frakturheilung und auf Osteoblasten und Osteoklasten in Kultur. In den *in vivo*-Untersuchungen wurde ein Rattenmodell verwendet, an welchem auch biomechanische und histologische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden [88,90,92]. In diesem Modell wurde die Fraktur durch einen intramedulären Kraftträger versorgt. In der Klinik ist neben der Marknagelung auch die Stabilisierung mittels einer Platte ein gängiges Verfahren. Daher sollte in dieser Studie die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von einer Plattenosteosynthese untersucht werden. Es wurde hierzu ein Rattenosteotomiemodell etabliert und eine beschichtete oder unbeschichtete Titanplatte zur Stabilisierung verwendet. Nach einer Standzeit von 42 Tagen erfolgte die biomechanische Torsionstestung und die histologische und histomorphometrische Auswertung des Osteotomiekallus.

**Wildemann B**, Bamdad P, Holmer C, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G.

Local delivery of growth factors from coated plates increases osteotomy healing in rats  
*BONE*, 2004, 34:862-868

### 3 Zusammenfassende Diskussion

Zur Behandlung von Knochenbrüchen und -defekten stehen eine Vielzahl von Osteosynthesystemen mit ausgereiften biomechanischen Eigenschaften zur Verfügung. Trotzdem kommt es noch zu einer relativ hohen Zahl an Komplikationen. Um diese Rate weiter zu reduzieren, werden verschiedenste Ansätze zur „Biologisierung“ von Osteosynthesen erforscht. Neben Oberflächenveränderungen wie Rauigkeitsmodifikationen oder Hydroxylapatitbeschichtungen sind auch die ersten Wachstumsfaktoren in der orthopädischen Chirurgie zugelassen (OP-1, Stryker Biotech, USA; rhBMP-2/ACS, Wyeth, USA). Außer diesen beiden Faktoren aus der TGF- $\beta$  Superfamilie sind noch verschiedene weitere Faktoren an der Knochenbildung und -heilung beteiligt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung [18,20,58,109]. Ein weiteres Forschungsfeld stellt die Applikationsmethode der Wachstumsfaktoren dar. Um den klinischen Ansprüchen Rechnung zu tragen, müssen die Applikationssysteme leicht zu handhaben sein, möglichst keine weiteren Eingriffe benötigen und eine gute Verträglichkeit ohne große Gewebsreaktionen aufweisen [54].

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war die Untersuchung der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren sowie der Biokompatibilität der Polymerbeschichtung mit speziellem Augenmerk auf die Frühphase der Heilung. Neben den *in vivo* Studien wurde *in vitro* der Effekt auf verschiedene frakturassoziierte Zelltypen analysiert. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- $\beta$ 1, BMP-2) aus einer biodegradierbaren Polymerbeschichtung von Implantaten die Knochenheilung am Klein- und Großtiermodell beschleunigt [47,48,84,88,89,90,91]. Mittels Dosisfindungsstudien wurde die beste Wirkung der eingesetzten Wachstumsfaktoren bei der mittleren getesteten Konzentration (5% IGF-I und 1% TGF- $\beta$ 1 in der Beschichtungsmasse) ermittelt [46]. Der Einsatz einer geringeren Konzentration hatte einen weniger stimulierenden Effekt, wobei die höhere Konzentration der mittleren nicht überlegen war. Die Untersuchung der Einzelfaktoren im Vergleich zur Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 ergab einen synergistischen Effekt auf die Knochenheilung [90]. Die Kombination war der Wirkung der einzelnen Faktoren deutlich überlegen. Die signifikanten Effekte der Wachstumsfaktoren auf die biomechanische Stabilität und histologische Kallusreifung nach 28 und 42 Tagen [88]

lassen eine Beeinflussung zellulärer Prozesse während der frühen Heilungsphase vermuten. Auf Grund dieser Überlegung wurden in den ersten zwei Publikationen der vorliegenden Arbeit die zellulären Prozesse der frühen Frakturheilung näher analysiert. Die beiden darauffolgenden Arbeiten hatten die Analyse des Wachstumsfaktoreinflusses auf isolierte Zellen (Osteoblasten und Osteoklasten) zum Ziel. Ein weiterer wichtiger Aspekt beim Einsatz von Wachstumsfaktoren in der orthopädischen Chirurgie stellt das Risiko der ektopen Ossifikation dar. Daher wurde die Sicherheit des Applikationssystems hinsichtlich der Gefahr ektooper Ossifikationen durch Wachstumsfaktoren im Weichgewebe untersucht. Die letzte Studie hatte die Übertragung der Wachstumsfaktorenapplikation zur Beeinflussung der Knochenheilung von einer extramedullären Platte im Rattenmodell zum Ziel.

### 3.1 Untersuchung der Frühphase der Knochenheilung

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, dass Wachstumsfaktoren wie Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) und Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen aufweisen und somit die Knochenheilung stimulieren können [62,71,72].

Beide Faktoren zeigten gemeinsame Effekte auf den Knochenstoffwechsel, wodurch ein synergistischer Effekt denkbar ist [82], welcher auch in eigenen Versuchen gezeigt werden konnte [90]. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche ergaben eine dosisabhängige Wirksamkeit von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 einzeln und kombiniert [100]. Die kombinierte Applikation verfügte über einen größeren stimulierenden Effekt auf die Zunahme der Knochenmatrix als die jeweilige Einzelapplikation [82]. Beide Faktoren stimulieren die Proliferation von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten während der Frakturheilung [69].

Zur Analyse der zellulären Effekte der lokal applizierten Wachstumsfaktoren erfolgten daher histologische und immunhistochemische Untersuchungen der frühen Zeitpunkte der Frakturheilung am Rattenmodell. Diese Studien zeigten eine fortgeschrittene Kallusreifung, die mit einem veränderten Proliferationsmuster verschiedener frakturassoziierter Zelltypen einherging. Das Proliferationsmuster der unbeeinflussten Heilung stellte sich wie folgt dar: es zeigte sich am Tag 5 nach der Fraktur eine starke Proliferation im Bindegewebe des sich bildenden Kallus. Am 10. Tag nach der Fraktur war eine starke Proliferationsaktivität in Chondrozyten im Randbereich des

knorpeligen Kallus und Osteoblasten im neu gebildeten Geflechtknochen detektierbar. Diese war am 15. Tag insgesamt geringer. Es waren aber immer noch PCNA-positive Zellen im Bindegewebe, im Knorpelrandbereich und am Geflechtknochen zu sehen. Vergleichbares konnte bereits in einer Arbeit von Iwaki et al. gezeigt werden [42]. Durch die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren kam es zu einer früheren Kallusreifung mit dem Auftreten von proliferierenden Chondrozyten am Tag 5, weniger PCNA-positiven Osteoblasten am Tag 10 und einem früheren Auftreten knochenmarkähnlicher Strukturen sowie einer damit einhergehenden Proliferationsaktivität am Tag 15. Diese Ergebnisse deuten auf einen mitogenen Einfluss der WF auf die frühe Phase der Heilung hin und sind in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die eine Bedeutung der Faktoren während der initialen Heilung, der Chondrogenese und der Knochenbildung beschrieben haben [22,39,40,44,45]. Als wichtiger Aspekt für die Biokompatibilität waren in den Untersuchungen keine Unterschiede aufgrund der Polymerbeschichtung und der Wachstumsfaktoren bezogen auf Fremdkörperreaktionen zu erkennen. Dies ist von großer Bedeutung, da für einige Biomaterialien auf Polymerenbasis negative Effekte wie vermehrte Makrophagenansammlung oder Bildung eines Resorptionssaums beschrieben worden sind [80]. Die verwendete PDLLA-Beschichtung zeigte jedoch keine unerwünschten Wirkungen in der Implantatumgebung. Die Lokalisation der Wachstumsfaktoren in den Gewebsschnitten auf Ebene der mRNA und des Proteins zeigte eine hohe Übereinstimmung zwischen den verwendeten Methoden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster überein [2,30,75,96,97,111]. Durch die exogene Gabe der Faktoren waren in diesen Untersuchungen keine Änderungen der mRNA und Proteinexpression zu detektieren. Die Quantifizierung der Wachstumsfaktoren mittels ELISA ist stark von der Aufarbeitungsmethode des Gewebes abhängig. Aufgrund der Bindung der WF an Bindungsproteine oder Liganden und deren Freisetzung im sauren Milieu wurde die Gewebsaufarbeitung bei saurem pH-Wert durchgeführt. Die Dimension der gemessenen IGF-I- und TGF- $\beta$ 1-Mengen im Gewebe sind mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar [33,52,102]. Die Untersuchungen wiesen deutliche Unterschiede in der Quantität der Wachstumsfaktoren im zeitlichen Verlauf auf. TGF- $\beta$ 1 zeigte vom Tag 5 an eine ca. 50%ige Erhöhung im frakturierten Knochen gegenüber dem unfrakturierten. Diese Erhöhung blieb bis zum Tag 15 erhalten. IGF-I

hingegen war am Tag 5 noch nicht erhöht, stieg aber vom Tag 10 bis zum Tag 15 stetig an.

Zwischen der unbeeinflussten Heilung und der durch WF stimulierten Heilung waren keine signifikanten Unterschiede in den IGF-I- und TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen messbar. Lediglich am Tag 15 war in der mit WF-behandelten Gruppe die IGF-I Konzentration bezogen auf das Gesamtprotein erhöht. Dies hängt mit dem Abfall der Proteingesamtmenge im Kallus am Tag 15 in der WF-Gruppe zusammen. Die Unterschiede in der Quantität der einzelnen Faktoren während der Heilung lassen auf ihre Bedeutung während der Heilung rückschließen. Die frühere und gleichmäßige Hochregulierung von TGF- $\beta$ 1 deutet auf eine Bedeutung schon in der sehr frühen Heilung hin, wobei IGF-I erst zu einem späteren Zeitpunkt hochreguliert wird und somit scheinbar nicht bei der initialen Kallusbildung mitwirkt.

### **3.2 Einfluss auf Osteoblasten und Osteoklasten *in vitro***

Die Untersuchungen der Frakturheilung zeigten einen positiven Einfluss von IGF-I und TGF- $\beta$ 1. Die *in vivo*-Situation erlaubt jedoch keine direkten Rückschlüsse bezüglich der Wirkung der Wachstumsfaktoren auf individuelle Zelltypen. Die gesehenen Effekte könnten direkt durch die Wachstumsfaktoren beeinflusst sein oder aber das Ergebnis von Interaktionen lokaler wie systemischer Effekte sein. Daher wurden im Folgenden Zellkulturversuche mit primär isolierten Osteoblasten und fusionierten Osteoklasten durchgeführt.

In der Osteoblastenkultur kam es durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zu einer signifikant gesteigerten Kollagen 1-Synthese. Die Proliferation blieb weitgehend unbeeinflusst. Die reine Polymerbeschichtung zeigte keinen Effekt auf die Osteoblasten. Der Effekt von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [27,28,43,56,112]. Ein wichtiger Aspekt dieser Studie war die Untersuchung der Haltbarkeit der Wachstumsfaktoren in der Beschichtung. Es zeigte sich kein Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den 5 und den 14 Monaten gelagerten Implantaten.

Da neben den knochenbauenden Osteoblasten den knochenresorbierenden Osteoklasten eine wichtige Funktion im Knochen und während der Heilung zukommt, wurde der Effekt der Wachstumsfaktoren auf diesen Zelltyp *in vitro* untersucht. Die



Aktivität der Osteoklasten wurde anhand von zwei Parametern betrachtet: der Fusionsrate von Monozyten zu mehrkernigen TRAP-positiven Zellen und der Resorptionsaktivität fusionierter Zellen (pit formation assay).

Die Ergebnisse beider Auswertmethoden zeigten eine Reduktion der Zellzahl und der Fusionslakunen durch die Applikation von PDLLA-beschichteten Titan-Proben mittels Tissue-Membranen. Dieser Effekt auf die Fusion wurde durch die Gabe IGF-I+TGF- $\beta$ 1 beschichteter Proben wieder aufgehoben. BMP-2 steigerte die Resorptionsaktivität der Osteoklasten, jedoch nicht deren Fusionsverhalten. Diese Studie zeigte einen entwicklungsabhängigen Effekt der eingesetzten Wachstumsfaktoren. IGF-I und TGF- $\beta$ 1 wirken primär während der Osteoklastogenese während BMP-2 Einfluss auf die Resorptionsaktivität hat. *In vivo*-Studien mit PDLLA-beschichteten Schrauben konnten eine Reduktion der Osteoklastenzahl und eine höhere Knochendichte in der PDLLA-Gruppe im Vergleich zur Titan-Gruppe messen [79] und stützen somit die Ergebnisse der *in vitro*-Studie. Zu der Wirkung der Wachstumsfaktoren sind in der Literatur positive Effekte von IGF-I, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 auf Osteoklasten beschrieben [36,49,68,77,83], welche mit den hier vorgestellten Ergebnissen einhergehen. Bei den bisherigen Studien wurde jedoch weder die Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Osteoklasten berücksichtigt noch der Effekt mehrerer Wachstumsfaktoren gleichzeitig untersucht.

Da bei der Kontrollgruppe keine Tissue-Membran zugegeben wurde, muss in weiteren Studien eine mögliche störende Interaktion der Membran mit den Zellen geklärt werden.

### 3.3 Effekt der Wachstumsfaktoren auf Weichgewebe

In zahlreichen *in vivo*-Studien an Maus und Ratte konnte eine ektope Ossifikation durch die Gabe von BMP-2 im Muskelgewebe induziert werden [15,74,76,106,110]. Ektope Ossifikationen stellen jedoch einen unerwünschten Effekt dar und sollten bei einem geeigneten Applikationssystem und durch die Wahl der Wachstumsfaktorenkonzentration nicht auftreten. In einem Großtiermodell wurde eine potentielle ektope Ossifikation durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren im Muskelgewebe untersucht. Dazu wurden polymerbeschichtete Titanplättchen mit Wachstumsfaktoren in den Muskel implantiert. Die Applikation der Wachstumsfaktoren (BMP-2 und Kombination von IGF-I und TGF- $\beta$ 1) mittels der Polymerbeschichtung

induzierte keine ektopen Ossifikationen im Schafsmuskel nach 84 Tagen. Es zeigte sich jedoch über den WF-beschichteten Seiten der Plättchen eine vergrößerte fibröse Kapsel, die auf den Einfluss der WF zurückzuführen ist. Der Applikationszeitraum (84 Tage) wurde in Anlehnung an andere Studien gewählt und hatte dort zu ektopen Ossifikationen nach BMP-2 Gabe geführt [70,76,110]. Es ist daher nicht anzunehmen, dass es zu einem späteren Zeitpunkt zu Ossifikationen kommen würde. In dem untersuchten Gewebe waren auch keine Knorpelzellen zu finden, welche in anderen Studien vor der Ossifikation im Gewebe detektierbar waren [70]. Erklärungen für das Fehlen ektoper Ossifikationen im Muskelgewebe nach BMP-2 Applikation könnten zum einen die Applikationsform und Dosierung und zum anderen die verwendete Tierspezies sein. Es ist bekannt, dass WF einen dosisabhängigen Effekt haben. Die eingesetzte Beschichtung von Implantaten setzt ca. 50% der eingearbeiteten Faktoren initial in den ersten 48 Stunden frei (IGF-I: 25µg, TGF-β1: 5µg, BMP-2: 25µg) gefolgt von einer kontinuierlichen Freisetzung weiterer 30% in den folgenden 40 Tagen [93]. Es ist möglich, dass diese Dosierung keinen osteoinduktiven Effekt auf mesenchymale Vorläuferzellen hat. Auch in anderen Studien konnte eine dosisabhängige ektople Ossifikation gesehen werden [51,74]. Geringe Dosen von BMP-2 appliziert von Calciumphosphat-Trägermaterial oder Kollagen führten zu keiner Ossifikation, wobei höhere Dosierungen Ossifikationen bewirkten. Dieses Studien wurden an Makaken-Affen und Ratten durchgeführt.

Ebenso wurde keine ektople Knochenbildung durch BMP-2 in einem anderen Schafsmodell nachgewiesen, wobei die gleiche Applikation im Nager zur ektopen Knochenbildung führte [61]. Hier könnte ein spezies-spezifischer Effekt vorliegen.

In der Literatur sind bisher keine Studien veröffentlicht, die Osteoinduktionen in nicht-skelettalem Gewebe durch die Gabe von IGF-I beschreiben. In lediglich einer Studie konnten durch die TGF-β1-Gabe ektople Ossifikationen bei Primaten hervorgerufen werden [29].

Die Wirksamkeit der lokal applizierten WF auf die Knochenheilung wurde jedoch in früheren Schafsstudien gezeigt. Hier bewirkte die lokale Applikation von WF aus der Polymerbeschichtung eine signifikant verbesserte Wirbelkörperperfusion bei Schafen [47,48], so dass die Wirkung der Faktoren auf die Knochenheilung im Schaf bestätigt ist.

### 3.4 Untersuchung der Osteotomieheilung

Die vorherigen Studien untersuchten den Einfluss der lokal von intramedullären Kraftträgern applizierten Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung. Da auch die Plattenosteosynthese ein gängiges Verfahren in der Klinik darstellt, sollte die Applikation der Wachstumsfaktoren von einer extramedullär angebrachten Plattenosteosynthese im Rattenmodell untersucht werden. Nachdem ein Kleintiermodell zur Plattenosteosynthese etabliert werden konnte, wurde der Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Heilung untersucht. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren und die Auswertmethoden waren identisch mit denen der Marknagelung und ließen somit einen Vergleich zu [88]. Nach 42 Tagen zeigte sich eine verbesserte Osteotomieheilung anhand der biomechanischen und histomorphometrischen Untersuchungen. Das maximale Drehmoment und die Mineralisation des Kallus waren durch die Wachstumsfaktorengabe signifikant erhöht. Vergleicht man beide Modelle, so zeigte sich in der Kontrollgruppe, dass die Fraktur mit Marknagelung schneller verheilt als die Osteotomie mit Plattenosteosynthese. Sowohl die biomechanische Stabilität als auch die histomorphometrischen Parameter wiesen auf eine bessere Heilung der Fraktur hin.

Die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 führte in beiden Modellen zu einer signifikanten Beschleunigung der Heilung, während der Heilungsfortschritt auch hier bei der Marknagelung deutlicher war.

Dieser Effekt kann durch die Unterschiede im Knochenheilungsmodell erklärt werden. Zum einen wies das Osteotomiemodell einen Spalt von 0,6 mm auf, wobei es beim Frakturmodell zu keinem Spalt kam. Hier kann eine Ursache für die langsamere Heilung in der Kontrollgruppe des Osteotomiemodells liegen. Auch die Applikationsform der Wachstumsfaktoren kann die Unterschiede erklären. Bei der Marknagelung wurden die Faktoren zirkulär im gesamten Markraum freigesetzt. Aufgrund der Freisetzung von der Platte kam es zu einer unilateralen Applikation von der Knochenaußenseite aus, wodurch keine gleichmäßige Verteilung erreicht wurde. Trotz der Unterschiede in der Heilung zwischen den Modellen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der Knochenheilung durch lokale Applikation von Wachstumsfaktoren von einer Plattenosteosynthese möglich ist.

#### 4 Zusammenfassung und Ausblick

Vorangegangene Versuche konnten einen deutlich stimulierenden Effekt der lokal aus einer Implantatbeschichtung freigesetzten Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 auf die Knochenheilung im Klein- und Großtiermodell zeigen [84,88,90,94]. Es stellte sich die Frage nach den zugrundeliegenden zellulären Prozessen.

Um diese Frage zu beantworten, wurden sowohl *in vivo*-Versuche an einem etablierten Frakturmodell durchgeführt, als auch *in vitro*-Versuche an humanen osteoblasten- und osteoklastenartigen Zellen.

Die histologische Beurteilung der mit Wachstumsfaktoren beeinflussten Heilung zeigte eine deutlich schnellere Reifung des Kallus, gekennzeichnet durch eine frühere Ausbildung von Knorpelarealen. Diese geht mit einer früheren Reifung sekundären Knochenmarks im Geflechtknochen des Kallus einher. Die histologischen Befunde spiegeln sich auch im veränderten Proliferationsmuster der verschiedenen Zelltypen wider. Durch die Applikation der Faktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 waren im Kallus früher proliferierende Chondrozyten und Osteoblasten zu erkennen, wohingegen die Proliferationsaktivität von mesenchymalen Zellen reduziert war. Nimmt man diese Ergebnisse und die Untersuchung der Heilung über einen Zeitraum von 84 Tagen [92] so wird deutlich, dass die Wachstumsfaktoren die Kallusreifung beschleunigten ohne die physiologischen Heilungsphasen zu verändern. Nach 84 Tagen zeigte der mit Wachstumsfaktoren behandelte Kallus die gleichen biomechanischen Eigenschaften und eine vollständige Heilung wie auch der Kallus der Kontrollgruppe. Vergleicht man die histologischen und biomechanischen Ergebnisse der unbehandelten und mit WF behandelten Frakturen, so wird deutlich, dass durch die WF-Gabe nach 42 Tagen eine Heilung erreicht wurde, die in der Kontrollgruppe erst nach 84 Tagen zu messen war.

Die Analyse der Wachstumsfaktorenquantität und Lokalisation im Kallus wies Unterschiede im zeitlichen Verlauf auf ohne jedoch einen Einfluss der lokal applizierten Wachstumsfaktoren deutlich zu machen. Die Wachstumsfaktorkonzentration von IGF-I stieg kontinuierlich ab Tag 10 in den Gruppen an, wobei TGF- $\beta$ 1 vom Tag 5 an eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum unfrakturierten Knochen aufwies, ohne Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Auch die Lokalisation der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$ 1 zeigte keine Unterschiede durch die lokale Wachstumsfaktorenapplikation. Das

Expressionsmuster auf Ebene der mRNA und des Proteins stellte eine vergleichbare zelluläre Verteilung im heilenden Kallus dar.

Die *in vivo*-Versuche deuten auf einen Effekt der Wachstumsfaktoren in der frühen Phase der Heilung hin. Es kam zu einem veränderten Proliferationsmuster und einer beschleunigten Kallusreifung, ohne Änderung der endogenen Wachstumsfaktorenexpression. Diese Versuche lassen jedoch keinen Rückschluss über die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf einzelne Zelltypen zu. Um dies näher zu untersuchen wurden *in vitro*-Zellkulturversuche an primären humanen osteoblasten- und osteoklastenartigen Zellen durchgeführt. In den Osteoblastenkulturen führte die Zugabe von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 von beschichteten Implantaten zu einer signifikanten Erhöhung der Kollagen1-Synthese. Das Titan oder die Polylaktidbeschichtung hatten keinen Einfluss auf die Osteoblasten. Kollagen-1 ist das strukturgebende extrazelluläre Protein des Knochengewebes und stellt 95% des Kollagenanteils. Eine vermehrte Syntheserate lässt auf eine Reifung der Osteoblasten durch die Wachstumsfaktorengabe schließen.

Die Ergebnisse der Osteoklastenkultur zeigten einen signifikant hemmenden Einfluss des Polymers auf die Fusions- und Resorptionsrate der Osteoklasten. Diese Hemmung wurde durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Polymerbeschichtung aufgehoben, wobei die Faktoren entwicklungspezifisch wirkten. Des Weiteren wurde die Wirkung der Wachstumsfaktoren, extramedullär von einer Plattenosteosynthese appliziert, untersucht. Durch die Wachstumsfaktorengabe war die biomechanische Stabilität des Knochens signifikant erhöht und eine fortgeschrittene Kallusreifung sichtbar im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Schlussfolgernd konnte anhand dieser Studien gezeigt werden, dass zelluläre Prozesse während der Knochenheilung durch die lokale Applikation von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 beschleunigt werden, ohne jedoch die physiologische Abfolge sowie die Wachstumsfaktorenexpression und -konzentration zu verändern. Eine Erklärung für die verbesserte Heilung liegt in der positiven Beeinflussung der Zellproliferation einhergehend mit einer beschleunigten Kallusreifung. Die Wachstumsfaktoren begünstigen die Osteoblastenmaturation und heben den hemmenden Einfluss des PDLLA auf Osteoklasten *in vitro* auf. Die lokale Applikation mittels PDLLA-Beschichtung erlaubt eine sichere Wachstumsfaktorengabe, die zu keinen ektopen Ossifikationen im Muskel führt.

Weiterführende Studien an primären osteoblastenartigen Zellen untersuchen derzeit mittels Mikroarray den Einfluss der einzelnen Wachstumsfaktoren auf die Expression osteoblastenspezifischer Gene. Diese Untersuchungen sollen weitere Informationen zur Wirkweise der Wachstumsfaktoren liefern. Des Weiteren werden regulatorische Proteine, die für die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten verantwortlich sind, in der Zellkultur quantifiziert. Diese Untersuchungen stellen Vorarbeiten zu geplanten Co-Kulturen von Osteoblasten und Osteoklasten dar. Für das Verständnis der Wirkweise von Wachstumsfaktoren sind mehr Informationen über deren Einfluss auf knochenbauende und -abbauende Zellen und deren direkte Interaktion notwendig.

Die Biokompatibilität ist eine wichtige Anforderung an Biomaterialien. Die bisherigen Studien konnten keinerlei negativen Effekt der Implantatbeschichtung auf die untersuchten Zelltypen oder aber die Heilungsvorgänge zeigen. In weiterführenden Untersuchungen wird derzeit die Fremdkörperreaktion näher untersucht. Mittels histologischer Färbung werden die knochenresorbierenden Osteoklasten dargestellt und immunhistologisch die Makrophagen. Erste Ergebnisse bestätigen die bisherigen Beobachtungen. Es kommt weder durch den Einsatz der Wachstumsfaktoren noch durch die Polymerbeschichtung zu einer verstärkten Gewebsreaktion.

Außerdem sollen weitere Wachstumsfaktoren und -kombinationen im etablierten Rattenfrakturmodell und in der Zellkultur untersucht werden, um eine bestmögliche Stimulation der Knochenheilung zu erreichen.

Die Übertragung der Wachstumsfaktorenapplikation in weitere orthopädische und unfallchirurgische Bereiche ist experimentell erfolgt. So wurden erfolgreich beschichtete Cages zur intervertebralen Spondylodese getestet [46,47,48].

Die Verwendung der Beschichtung als Carrier für Antibiotika zeigte experimentell einen deutlichen Nutzen zur Reduktion implantat-assoziiertes Infektionen [64]. Ein genamicinbeschichteter Nagel ist in der klinischen Dokumentation und die ersten Patienten mit offenen Unterschenkelfrakturen wurden damit behandelt.

In Kooperation mit internationalen Arbeitsgruppen wird die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren in einem diabetischen Rattenmodell und zur Implantateinheilung am Großtier untersucht.

## Literaturverzeichnis

- [1] 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.* 8 [2], Seite 111-115.
- [2] Andrew, J.; Hoyland, J.; Andrew, S.; Freemont, A. und Marsh, D. (1993): Demonstration of TGF-beta1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing, *Calcif Tissu Int* 52, Seite 74-78.
- [3] 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* 8 [2], Seite 238-246.
- [4] Ashhurst DE; Hogg J und Perren SM (1982): A method for making reproducible experimental fractures of the rabbit tibia., *Injury* 14 [3], Seite 236-242.
- [5] Aspenberg, P. und Lohmander, LS. (1989): Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats., *Acta Orthop Scand* 60 [4], Seite 473-476.
- [6] Aspenberg, P.; Wang, J. S.; Choong, P. und Thorngren, K. G. (1994): No effect of growth hormone on bone graft incorporation. Titanium chamber study in the normal rat, *Acta Orthop.Scand.* 65 [4], Seite 456-461.
- [7] Bak, B. (1993): Fracture healing and growth hormone - A biochemical study in the rat, *Dan Med Bull* 40, Seite 519-536.
- [8] Bak, B. und Andreassen, T. T. (1988): Reduced energy absorption of healed fracture in the rat, *Acta Orthop.Scand.* 59 [5], Seite 548-551.
- [9] Bak, B.; Jorgensen, P. und Andreassen, T. (1990): Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat, *Acta Orthop Scand* 61, Seite 54-57.
- [10] Bak, B.; Jorgensen, P. und Andreassen, T. (1990): Increased mechanical strength of healing rat tibial fracture treated with biosynthetic human growth hormone, *Bone* 11, Seite 233-239.
- [11] 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* 264, Seite 295-301.
- [12] 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.* 65 [1], Seite 83-89.

- [13] Baylink, D.; Finkelman, R. und Mohan, S. (1993): Growth factors to stimulate bone formation, *J Bone Miner Res* 8, *Supplement 2*, Seite 565-572.
- [14] 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* 8 [6], Seite 753-761.
- [15] Bessho, K.; Carnes, D. L.; Cavin, R. und Ong, J. L. (2002): Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2, *J.Biomed.Mater.Res.* 61 [1], Seite 61-65.
- [16] Bhandari M, Guyatt GH, Tong D, Adili A, Shaughnessy SG. (2000): Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and metaanalysis, *J Orthop Trauma* 14, Seite 2-9.
- [17] 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.* 37 [4], Seite 553-565.
- [18] Bolander ME (1992): Regulation of fracture repair by growth factors., *Proc Soc Exp Biol Med* 200 [2], Seite 165-170.
- [19] Bonnarens, F. und Einhorn, T. A. (1984): Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone, *J.Orthop.Res.* 2 [1], Seite 97-101.
- [20] Bostrom, M. P.; Saleh, K. J. und Einhorn, T. A. (1999): Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models, *Orthop.Clin.North Am.* 30 [4], Seite 647-658.
- [21] 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* 83 [8], Seite 1219-1230.
- [22] Canalis E (1980): Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria., *J Clin Invest* 66 [4], Seite 709-719.
- [23] 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* 9 [4], Seite 243-246.



- [24] 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* 107 [5], Seite 1969-1975.
- [25] Centrella, M.; McCarthy, T. L. und Canalis, E. (1988): Skeletal tissue and transforming growth factor beta, *FASEB J.* 2 [15], Seite 3066-3073.
- [26] Court-Brown, C. und Penning, D. (1997): *Tibia & Fibula*, Butterworth-Heinemann Medical, Oxford.
- [27] D'avis, P. Y.; Frazier, C. R. ; Shapiro, J. R. und Fedarko, N. S. (1997): Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells, *Biochem.J* 324 ( Pt 3), Seite 753 -760.
- [28] Denis, I.; Pointillart, A. und Lieberherr, M. (1994): Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on the proliferation and differentiation of cultured pig bone cells and rat calvaria cells, *Growth Regul.* 4 [3], Seite 123-130.
- [29] Duneas, N.; Crooks, J. und Ripamonti, U. (1998): Transforming growth factor-beta 1: induction of bone morphogenetic protein genes expression during endochondral bone formation in the baboon, and synergistic interaction with osteogenic protein-1 (BMP-7), *Growth Factors* 15 [4], Seite 259-277.
- [30] 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.* 23 [5], Seite 253-259.
- [31] Einhorn, T. (1991): Mechanisms of fracture healing, *Hosp.Pract.Off.Ed.* 26 *Suppl* 1, Seite 41-45.
- [32] Einhorn, T. A.; Majeska, R. J.; Mohaideen, A.; Kagel, E. M.; Bouxsein, M. L.; Turek, T. J. und Wozney, J. M. (2003): A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair, *J.Bone Joint Surg.Am.* 85-A [8], Seite 1425-1435.
- [33] Finkelman, R. D.; Linkhart, T. A.; Mohan, S.; Lau, K. H.; Baylink, D. J. und Bell, N. H. (1991): Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, Seite 3657-3660.
- [34] Frost, H. M. (1966): *The Bone Dynamics in Osteoporosis and Osteomalacia.*, Charles C. Thomas, Springfield, IL.

- [35] 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* 84-A [12], Seite 2123-2134.
- [36] Guicheux, J.; Heymann, D.; Rousselle, A. V.; Guin, F.; Pilet, P.; Yamada, S. und Daculsi, G. (1998): Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor I: an in vitro study, *Bone* 22 [1], Seite 25-31.
- [37] Hadjiargyrou, M.; Lombardo, F.; Zhao, S.; Ahrens, W.; Joo, J.; Ahn, H.; Jurman, M.; White, D. W. und Rubin, C. T. (2002): Transcriptional profiling of bone regeneration: Insight into the molecular complexity of wound repair, *Journal of Biological Chemistry* 277 [33], Seite 30177-82.
- [38] Henley MB, Chapman JR, Agel J, Harvey EJ, Whorton AM, Swiontkowski MF. (1998): Treatment of type II, IIIA and IIIB open fractures of the tibial shaft: a prospective comparison of unreamed interlocking intramedullary nails and half-pin external fixators., *J Orthop Trauma* 12, Seite 1-7.
- [39] Hock JM; Canalis E und Centrella M (1990): Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae., *Endocrinology* 126 [1], Seite 421-426.
- [40] Hock, J.; Centrella, M. und Canalis, E. (1988): Insulin like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication, *Endocrinology* 122 [1], Seite 254-260.
- [41] 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* 250 [4 Pt 1], Seite 367-372.

- [42] Iwaki, A.; Jingushi, S.; Oda, Y.; Izumi, T.; Shida, J. I.; Tsuneyoshi, M. und Sugioka, Y. (1997): Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry, *J Bone Miner Res* 12 [1], Seite 96-102.
- [43] Jaunberzins, A.; Gutmann, J. L.; Witherspoon, D. E. und Harper, R. P. (2000): Effects of calcium hydroxide and transforming [correction of tumor] growth factor-beta on collagen synthesis in subcultures I and V of osteoblasts, *J Endod.* 26 [9], Seite 494-499.
- [44] Joyce, M.; Jingushi, S. und Bolander, M. (1990): Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair, *Orthop Clin North Am* 21 [1], Seite 199-209.
- [45] 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* 110 [6], Seite 2195-2207.
- [46] 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- $\beta$ 1 application in a sheep cervical spine fusion model., *Eur Spine J* 12 [5], Seite 464-473.
- [47] 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 )* 97, Seite 40-48.
- [48] 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* 27 [16], Seite 1710-1723.
- [49] Kaneko, H.; Arakawa, T.; Mano, H.; Kaneda, T.; Ogasawara, A.; Nakagawa, M.; Toyama, Y.; Yabe, Y.; Kumegawa, M. und Hakeda, Y. (2000): Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts, *Bone* 27 [4], Seite 479-486.
- [50] 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* 3 [2], Seite 147-158.

- [51] Kusumoto, K.; Bessho, K.; Fujimura, K.; Akioka, J.; Okubo, Y.; Wang, Y.; Iizuka, T. und Ogawa, Y. (2002): Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in muscles of non-human primates, *J Int.Med.Res* 30 [3], Seite 251-259.
- [52] Lammens, J.; Liu, Z.; Aerssens, J.; Dequeker, J. und Fabry, G. (1998): Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis, *J Bone Miner.Res* 13 [2 ], Seite 279-286.
- [53] Li J; Ahmad T; Spetea M; Ahmed M und Kreicbergs A (2001): Bone reinnervation after fracture: a study in the rat, *J Bone Miner Res* 16 [8], Seite 1505-1510.
- [54] Li RH und Wozney JM (2001): Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins, *Trends Biotechnol* 19 [7], Seite 255-265.
- [55] 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.* 14 [6], Seite 969-979.
- [56] Lilli, C.; Marinucci, L.; Stabellini, G.; Belcastro, S.; Becchetti, E.; Balducci, C.; Staffolani, N. und Locci, P. (2002): Biomembranes enriched with TGFbeta1 favor bone matrix protein expression by human osteoblasts in vitro, *J Biomed.Mater.Res* 63 [5], Seite 577-582.
- [57] Lind, M. (1998): Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation, *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 283 [Suppl], Seite 2-37.
- [58] Lind, M. und Bunger, C. (2001): Factors stimulating bone formation, *Eur.Spine J* 10 Suppl 2, Seite S102-S109.
- [59] Lind, M.; Deleuran, B.; Thestrup, Pedersen K.; Soballe, K.; Eriksen, E. F. und Bunger, C. (1995): Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors, *APMIS* 103 [2], Seite 140-146.
- [60] 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.* 64 [5], Seite 553-556.
- [61] Lindholm, T. C.; Lindholm, T. S.; Alitalo, I. und Urist, M. R. (1988): Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) induced repair of skull trephine defects in sheep, *Clin.Orthop* 227, Seite 265-268.
- [62] Linkhart, T. A.; Mohan, S. und Baylink, D. J. (1996): Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP, *Bone* 19 [1 Suppl], Seite 1S-12S.

- [63] 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* 80 [2], Seite 174-183.
- [64] 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* 32 [5], Seite 521-531.
- [65] Marks SC und Odgren PR (2003): Structure and Development of the Skeleton, Bilezikian J.P.; Raisz, L. G. und Rodan, G. A., *Principles of Bone Biology*, 2. Auflage, Seite 3-15, Academic Press, San Diego.
- [66] Matkovic V (1996): Nutrition, genetics and skeletal development, *J Am Coll Nutr* 15 [6], Seite 556-569.
- [67] 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* 130 [3], Seite 1303-1308.
- [68] Mochizuki, H.; Hakeda, Y.; Wakatsuki, N.; Usui, N.; Akashi, S.; Sato, T.; Tanaka, K. und Kumegawa, M. (1992): Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts, *Endocrinology* 131 [3], Seite 1075-1080.
- [69] Mohan, S. und Baylink, D. J. (1991): Bone growth factors, *Clin.Orthop.* 263, Seite 30-48.
- [70] Nakagawa T; Sugiyama T; Kamei T; Murata T und Tagawa T (2001): An immunolight- and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat., *Arch Oral Biol* 46 [5], Seite 403-411.
- [71] 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.* 65 [1], Seite 37-41.
- [72] 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* 40, Seite 91-96.
- [73] Noda, M. und Rodan, G. A. (1986): Type-beta transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells, *Biochem.Biophys.Res Commun.* 140 [1], Seite 56-65.

- [74] Oda, S.; Kinoshita, A.; Higuchi, T.; Shizuya, T. und Ishikawa, I. (1997): Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *J Med.Dent Sci* 44 [3], Seite 53-62.
- [75] Okazaki, K.; Jingushi, S.; Ikenoue, T.; Urabe, K.; Sakai, H. und Iwamoto, Y. (2003): Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing, *J.Orthop.Res.* 21 [3], Seite 511-520
- [76] 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* 29 [1], Seite 62-66.
- [77] Otsuka, E.; Notoya, M. und Hagiwara, H. (2003): Treatment of myoblastic C2C12 cells with BMP-2 stimulates vitamin D-induced formation of osteoclasts, *Calcif.Tissue Int.* 73 [1], Seite 72-77.
- [78] Parfitt, A. M. (2002): Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression, *Bone* 30 [1], Seite 5-7.
- [79] Partale K; Klein P; Schell H; Schmidmaier G; Schiller R; Bragullla H und Duda G.N (2003): Poly(D,L-lactide) coating stimulates osseous integration of mechanically loaded and unloaded Schanz screws, 8th Meeting of the ISFR, Toronto, Seite 46.
- [80] 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.* 27 [1], Seite 42-50.
- [81] Pfeilschifter, J.; D'Souza, S. M. und Mundy, G. R. (1987): Effects of transforming growth factor-beta on osteoblastic osteosarcoma cells, *Endocrinology* 121 [1], Seite 212-218.
- [82] 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* 127 [1], Seite 69-75.
- [83] Quinn, J. M.; Itoh, K.; Udagawa, N.; Hausler, K.; Yasuda, H.; Shima, N.; Mizuno, A.; Higashio, K.; Takahashi, N.; Suda, T.; Martin, T. J. und Gillespie, M. T. (2001): Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions, *J.Bone Miner.Res.* 16, Seite 1787-1794.

- [84] 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* 30 [1], Seite 144-151.
- [85] 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* 24 [2], Seite 81-88.
- [86] Schenk, R. K. und Willenegger, H. R. (1977): Zur Histologie der primären Knochenheilung, *Unfallheilkunde* 80, Seite 155-160.
- [87] 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)* 124 [5], Seite 602-607.
- [88] 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- $\beta$ 1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats, *Bone* 28 [4], Seite 341-350.
- [89] 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* 6, Seite 618-622.
- [90] 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 healing in rats - Single versus combined application of IGF-I and TGF- $\beta$ 1 -, *Acta Orthop.Scand.* 74, Seite 604-610.
- [91] Schmidmaier G; Wildemann B; Melis, B; Krummrey G; Einhorn A.; Haas N und Raschke M (2004): Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat, *Eur J Trauma* 30, Seite 35-42.
- [92] Schmidmaier G; Wildemann B; Ostapowicz D; Kandziora F; Stange R; Haas N P und Raschke M (2004): Long term effects of local growth factor (IGF-I AND TGF-1) treatment on fracture healing - A safety study for using growth factors -, *J Orthop Res* 22[3], Seite 514-9.

- [93] 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.* 58 [4], Seite 449-455.
- [94] 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* 31 [1], Seite 165-172.
- [95] Solheim, E. (1998): Growth factors in bone, *Int.Orthop.* 22 [6], Seite 410-416.
- [96] Steinbrech, D. S.; Mehrara, B. J.; Rowe, N. M.; Dudziak, M. E.; Luchs, J. S.; Saadeh, P. B.; Gittes, G. K. und Longaker, M. T. (2000): Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats, *Plast.Reconstr.Surg* 105 [6], Seite 2028-2038.
- [97] Tatsuyama K; Maezawa Y; Baba H; Imamura Y und Fukuda M (2000): Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone., *Eur J Histochem* 44 [3], Seite 269-278.
- [98] Thaller, SR.; Hoyt, J.; Tesluk, H. und Holmes, R. (1993): Effect of insulin-like growth factor-1 on zygomatic arch bone regeneration: A preliminary histological and histometric study, *Ann Plast Surg* 31, Seite 421-428.
- [99] 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* 4 [1], Seite 35-39.
- [100] Trippel, S.; Coutts, R.; Einhorn, T.; Mundy, R. und Rosenfeld, R. (1996): Growth factors as therapeutic agents, *J Bone Joint Surg* 78A [8], Seite 1272-1286.
- [101] Trippel, S.; Wrobelwski, J.; Makower, A. M.; Whelan, M.; Schoenfeld, D. und Doctrow, S. (1993): Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth factor I and basic fibroblast growth factor, *J Bone and Joint Surg (Am)* 75-A, Seite 177-189.
- [102] Ueland, T.; Ebbesen, E. N.; Thomsen, J. S.; Mosekilde, L.; Brixen, K.; Flyvbjerg, A. und Bollerslev, J. (2002): Decreased trabecular bone biomechanical competence, apparent density, IGF-II and IGFBP-5 content in acromegaly, *Eur J Clin Invest* 32 [2], Seite 122-128.
- [103] 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* 23 [1], Seite 1-16.



- [104] Utvag SE und Reikeras O (1998): Effects of nail rigidity on fracture healing. Strength and mineralisation in rat femoral bone, Arch Orthop Trauma Surg 118 [1-2], Seite 7-13.
- [105] Wilton, P. (1992): Treatment with recombinant human insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome)., Acta Paediatr.Suppl. 383, Seite 137-142.
- [106] Yamamoto, M.; Tabata, Y. und Ikada, Y. (1998): Ectopic bone formation induced by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein, J.Biomater.Sci.Polym.Ed 9 [5], Seite 439-458.
- [107] Yasko, A. W.; Lane, J. M.; Fellingner, 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. 74 [5], Seite 659-670.
- [108] Yasui, N.; Sato, M.; Ochi, T.; Kimura, T.; Kawahata, H.; Kitamura, Y. und Nomura, S. (1997): Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat, J Bone Joint Surg 79-B, Seite 824-830.
- [109] Yoon, S. T. und Boden, S. D. (2002): Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies, Clin.Orthop [395], Seite 33-43.
- [110] 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 26 [2], Seite 112-115.
- [111] 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 60 [3], Seite 392-397.
- [112] Zhang, H; Ahmad, M und Gronowicz, G (2003): Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF-[beta]1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials, Biomaterials 24 [12], Seite 2013-2020.

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert P. Haas, Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, der es mir ermöglichte, in seiner Einrichtung meinem wissenschaftlichen Interesse uneingeschränkt nachzugehen.

Weiter gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Raschke, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universität Münster, der mir stets unterstützend zur Seite stand.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Herrn PD. Dr. Gerhard Schmidmaier. Ohne sein Vertrauen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Er hat die experimentellen Grundsteine zu dieser Arbeit gelegt und mich immer aufs Vollste unterstützt.

Großer Dank gilt auch meinen Kollegen Dipl. Ing. Anke Kadow-Romacker, Dr. med Martin Lucke und Dipl. Ing. Marc Lübberstedt für Ihre Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Stemberger (München), der mir immer bei Fragen zur Beschichtungstechnologie Hilfe geben konnte.

Diese Arbeit war nur durch die sehr gewissenhafte und intensive Mitarbeit der Doktoranden und Diplomanden möglich. Daher gilt mein aufrichtiger Dank dem Enthusiasmus, der in die Durchführung der experimentellen Untersuchungen investiert wurde:

Frau Karen Baehr, Herrn Peyman Bamdad, Herrn Axel Baumgartner, Frau Dr. 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, Herrn Moritz Kapp, Herrn Martin Kretschmar, Frau Henrike Kuhn, Frau Heidrun Malzacher, Herrn Björn Melis, Frau Svenja Mohr, Herrn Sebastian Ordell, 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.

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, Frau Claudia Schaar und besonders Herrn Univ.-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 Firma Synthes/Stratec (USA) und die Berliner Sparkassenstiftung Medizin wäre die Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Britt Wildemann

**Lebenslauf**

Person: Britt Wildemann  
Geboren am 30. September 1969 in Itzehoe

Adresse: Zentrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow  
Augustenburger Platz 1  
13353 Berlin

1989 Abitur, Auguste-Viktoria-Gymnasium Itzehoe

1990-1991 Studium der Germanistik (TU-Berlin)

SS 1991 Studium der Biologie (TU-Berlin)

WS 1991-1995 Studium der Biologie (FU-Berlin)

Okt.-Dez. 1994 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. H. Reichert, Basel, CH

Jan. 1996-1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neurobiologie, FU-Berlin, AG Prof. G. Bicker

Juli 1998 Summer course „Neurobiology of Drosophila“ Cold Spring Harbour, NY, USA

August 1998 Forschungsaufenthalt bei Prof. R. Gillette, Urbana IL, USA

1997 -1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut Zellbiologie, TIHO-Hannover, AG Prof. G. Bicker

Dezember 1998 Promotion (*magna cum laude*) „The nitric oxide and cGMP-system during the development of Drosophila melanogaster“, FU-Berlin, Inst. Für Neurobiologie, Prof. Dr. Gert Bicker

Seit Januar 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungslabor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité, Campus Virchow

## Eidstattliche Erklärung

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.

.....7. April 2004.....

Datum

.....Dr. rer. nat. Britt Wildemann.....

Unterschrift