

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
Physikalische Medizin und Rehabilitation
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Die Regeneration großer segmentaler Knochendefekte mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von Evi Fleischhacker
aus Karlsruhe
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Frick
Prof. Dr. med. Stephan Kellnar

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Oliver Betz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

„Verändere die Welt, sie braucht es! Denn wie sie ist, kann sie nicht bleiben.“

BertoltBrecht

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Einführung in die Thematik	2
1.2	Knochen	3
1.2.1	Knochenstoffwechsel	3
1.2.2	Knochenregeneration	4
1.3	Knochenheilungsstörungen	6
1.4	Therapie von Knochendefekten mit Heilungsstörung	10
1.4.1	Autograft	10
1.4.2	Allograft	11
1.4.3	Bone morphogenetic proteins	12
1.4.4	Gentransfer	16
1.5	Fragestellung und Aufgaben	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Vektor	21
2.2.2	Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)	23
2.2.3	Defektmodell und Gruppeneinteilung	25
2.2.4	Fixateur	27
2.2.5	Gewebeentnahme und Transduktion	28
2.2.6	Operation	29
2.2.7	Entnahme der Femora	34
2.2.8	MicroCT	35
2.2.9	Biomechanik	36
2.2.10	Histologie	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Röntgenbilder	40
3.2	MicroCT - Bilder	40
3.2.1	Kontrollen	40
3.2.2	Ad.BMP-6-aktiviertes Fettgewebe	53
3.3	MicroCT - Knochenvolumen im Defekt	58
3.4	Biomechanik	65
3.5	Histologie	67
3.6	ELISA	73

4	Diskussion	74
4.1	Transplantat	76
4.2	Wachstumsfaktor	78
4.3	Tiermodell	79
4.4	Defektmodell	81
4.5	Auswerteverfahren	83
4.5.1	MicroCT	83
4.5.2	Biomechanik	84
4.5.3	Histologie	84
4.6	Ergebnisse	86
4.6.1	ELISA	86
4.6.2	MicroCT-Bilder	86
4.6.3	Knochenvolumen im Defekt	88
4.6.4	Biomechanik	89
4.6.5	Histologie	90
4.7	Ausblick	92
5	Zusammenfassung	93
	Literatur	95
	Abbildungsverzeichnis	106
	Tabellenverzeichnis	111
	Anhang	112

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Die Therapie großer Frakturen und Pseudarthrosen stellt im klinischen Alltag immer wieder eine Herausforderung dar. Der Standard besteht in der Behandlung mit autologen oder allogenen Knochentransplantaten, diese Methoden sind allerdings mit zahlreichen Problemen behaftet, was nicht selten zur Amputation einer Extremität führt. Ziel ist darum die Entwicklung neuer biologischer Methoden, wie solche mit Wachstumsfaktoren, z.B. Bone morphogenetic Protein 6 (BMP-6).

Der Bedarf an effektiven und beschleunigten Therapien zur Knochenheilung ist immens. Da die physiologische Heilung von Knochenbrüchen ein komplexes und störanfälliges System darstellt [77], kommt es bei ca. 10% aller Frakturen zu einer verzögerten Heilung. Bei vorhandenen Risikofaktoren, zu welchen auch Diabetes mellitus zählt, werden sogar über 30% angegeben. [90] Gerade in Zeiten einer immer älter und morbider werdenden Bevölkerung wird diese Zahl in den kommenden Jahren vermutlich noch steigen.

Den „Goldstandard“ stellt die Versorgung mit autologen Knochentransplantaten, vor allem aus dem Beckenkamm, dar. Hierdurch wird der Patient aber mit einem zweiten, häufig sehr schmerzhaften Eingriff konfrontiert. Wobei Studien belegen, dass bei ca. 30% auch dann nicht die gewünschte Heilung erfolgt. [10]

1965 entdeckten Urist et al. die osteoinduktive Wirkung von demineralisierter Knochenmatrix, seither werden BMPs untersucht, um sich ihre Fähigkeiten in der Klinik zu Nutze zu machen. [100] Seit 2001 bzw. 2002 kommen dort bereits die rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren rhBMP-7 (Osigraft[®], Opgenra[®]) und rhBMP-2 (InductOs[®]) zum Einsatz. [35, 78] Studien, die die osteoinduktive Wirkung verschiedener BMPs untersucht haben, konnten zeigen, dass neben den bereits pharmazeutisch genutzten Wachstumsfaktoren auch BMP-6 eine sehr gute Wirkung im Hinblick auf die Knochenentstehung aufweist. [49, 58]

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit dieser Proteine ist der Erfolg bei direkter Einbringung allerdings nur begrenzt vorhanden. So werden sehr große Mengen Wachstumsfaktor nötig, was die Anwendung teuer und unsicher macht. Aufgrund dessen besteht der Ansatz dieser Arbeit darin, die genetische Information für den Wachstumsfaktor in den Defekt einzubringen. So können länger anhaltende Regenerationsstimuli erreicht werden. Weiterhin zeigte sich, dass die freigesetzten Proteine eine bessere Wirksamkeit aufweisen als die rekombinant hergestellten. [32] Der in dieser Arbeit verwendete Gentransfer besteht in einer vereinfachten ex-vivo-Methode, was bedeutet, dass in einer Petrischale das gewünschte Gen direkt in Zellen von Gewebestücken transferiert wird. Hierbei ist keine Isolierung und anschließende Kultivierung sowie Expansion der Zellen notwendig.

1.2 Knochen

1.2.1 Knochenstoffwechsel

Knochen geben dem Körper als Gerüst seine Form, sie sind Ansatzpunkt für unsere Muskeln und somit eine wesentliche Voraussetzung für die Mobilität. Am Auf- und Abbau sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten beteiligt, welche miteinander über ein komplexes System kommunizieren. So entsteht ein dynamisches Gleichgewicht, welches sich der jeweiligen mechanischen Belastung anpassen kann. [89, 69]

Im Wachstumsalter entsteht zunächst durch enchondrale Ossifikation Geflechtknochen, der im Anschluss in Lamellenknochen umgewandelt wird. Hierbei ist eine ausgeglichene Muskelaktivität von essenzieller Bedeutung, da Knochen nur dort entsteht, wo durch Druck und Dehnung eine Beanspruchung vorliegt. Auch im Erwachsenenalter wird Knochen nach diesem Prinzip aus Bindegewebe gebildet. [69]

Die extrazelluläre Matrix des Knochens gliedert sich in zwei Bestandteile, die verkalkte sowie die unverkalkte. Zwei Drittel sind verkalkt und bestehen aus Calciumhydroxylapatit und anderen Calciumphosphaten, welche überwiegend als Kristalle vorliegen. Diese Mineralien geben dem Knochen die benötigte hohe Kompressionsfestigkeit. Außerdem stellen sie den größten Calciumvorrat im Körper dar, der je nach Bedarf auf- bzw. abgebaut wird. Diese Vorgänge werden durch das Parathormon (Knochenabbau, Calciumfreisetzung) und seinen Gegenspieler, das Calcitonin (Knochenaufbau, Calciumeinbau), gesteuert. Ein Drittel der extrazellulären Matrix ist unverkalkt und besteht aus organischen Substanzen, welche dem Knochen die benötigte Zugfestigkeit verleihen. Dieser Teil, auch Osteoid genannt, wird von den Osteoblasten gebildet und besteht zu 90% aus Kollagen Typ-I. Die restlichen 10% stellen verschiedene Proteine wie Proteoglykane, Osteocalcin u.a. dar. Aufgrund dieser hohen Stoffwechselaktivität befinden sich Osteoblasten vor allem in der Nähe von Gefäßen. [89]

Bei der Mineralisierung der Matrix werden zwischen 5% und 10% der Osteoblasten eingemauert und so zu Osteozyten. Die Syntheseleistung dieser Zellen ist nicht sehr groß. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Steuerung der Calciumkonzentration sowie der Signal- und Stoffübertragung mit Hilfe ihrer Fortsätze. Von Osteoblasten werden außerdem diverse Botenstoffe, wie Prostaglandine, Interleukine, Transforming Growth Factor β (TGF- β) und Bone morphogenetic Proteins (BMPs) gebildet. Ein Teil dieser wird in den Knochen eingebaut und im Falle von Verletzungen bzw. im Rahmen des Remodellings freigesetzt und aktiviert. [89, 69]

Hierbei spielen die Osteoklasten eine wichtige Rolle. Sie synthetisieren unter anderem proteolytische Enzyme, die die eingebauten Botenstoffe aktivieren. Die Hauptaufgabe, die

diese Zellen erfüllen, ist die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen. Hierzu ist die dem Knochen zugewandte Zellmembran stark aufgefaltet, die sog. Ruffled Border. In den Raum zwischen Zelle und Knochen (Howship-Lakune) sezerniert der aktive Osteoklast dann Protonen, welche für ein saures Milieu sorgen. Dadurch und durch die Sekretion lysosomaler Enzyme, wie Phosphatasen und Proteasen, wird der Knochen abgebaut und Calcium freigesetzt.

Die Regulation dieser Zellen erfolgt über eine negative Feedbackschleife: Durch die erhöhte Calciumkonzentration in den Howship-Lakunen steigt auch der Calciumwert intrazellulär, wodurch die Sekretion der Osteoklasten gehemmt wird. [89] Die humorale Kontrolle erfolgt zum einen über Calcitonin, ein Hormon aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse, [75] welches die Zellen innerhalb weniger Minuten inaktivieren kann. Zum anderen jedoch auch über Transmitter, die von Osteoblasten ausgeschüttet werden, wie Prostaglandin E₂ und verschiedene Zytokine, welche die Aktivität der knochenabbauenden Zellen erhöhen. Ebenso wirken auch Calcitriol und Parathormon auf Osteoklasten.

Die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten wird durch Parathormon, welches in der Nebenschilddrüse gebildet wird, gehemmt. Calciferole aus der Niere und Calcitonin hingegen regen die Osteoblasten an. Diese Hormone wirken vor allem über die Ausschüttung von Transmittern wie TGF- β , alkalische Phosphatase und Osteocalcin. [89, 69]

Die Ernährung des Knochens erfolgt zu 80% durch Gefäße im Endost und Periost, nur ca. 20% des Blutes fließen in Gefäßen, die sich im Volkmann- und Haversraum befinden. Osteozyten sind maximal 200 μm von einem Gefäß entfernt, was einen Hinweis darauf gibt, dass auch sie einen nicht unwesentlichen Stoffwechsel betreiben.

Nach Frakturen kann die Durchblutung des Knochens innerhalb weniger Tage auf ein Vielfaches des Normalwertes ansteigen. [89]

1.2.2 Knochenregeneration

Voraussetzung für die vollständige Knochenheilung nach einer Fraktur sind die drei Blaste Endost, Periost und Havers-System. Wichtige Faktoren sind aber auch die intakte Durchblutung, die Ruhigstellung des Defekts sowie der Kontakt der beiden Fraktarenden zueinander. Hierin besteht das Problem von Knochendefekten, z.B. nach Resektion pathologisch veränderter Knochenanteile. Dabei ist insbesondere der Kontakt der Knochenenden oftmals nicht zu gewährleisten, wenn man keine deutliche Verkürzung der Extremität in Kauf nehmen möchte, wodurch eine Heilung des Defekts sehr schwierig werden kann.

Pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark sezernieren bei einer Fraktur bzw. einem Defekt Wachstumsfaktoren wie TGF- β und BMPs sowie Zytokine in den Spalt. [44] Außerdem werden solche Transmitter, welche wie oben beschrieben im Knochen eingebaut sind,

auch durch den mechanischen Vorgang des Knochenbruchs freigesetzt. [89] Diese Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellinfiltration, der Angiogenese und der Differenzierung von Zellen. [44] Bei der Knochenheilung unterscheidet man zwischen einer primären und einer sekundären Form, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Primäre Knochenheilung Die primäre oder direkte Knochenheilung ist die vom Traumatologen gewünschte Form, da es hierbei zu einer minimalen Kallusbildung kommt. Die Voraussetzungen sind wie oben beschrieben eine gute Perfusion, der Kontakt der Knochenenden zueinander sowie die suffiziente Ruhigstellung. So wird bei stabiler Fixation und intakter Durchblutung der Fraktur- bzw. Defektspalt direkt von den Osteonen der Knochenenden durchzogen. Diesen Vorgang nennt man auch Kontaktheilung. Falls doch kleine Spalten verbleiben, werden diese im Rahmen der Spalthheilung durch Geflechtknochen, durch Endost und Periost sowie durch den Umbau des Havers-Systems aufgefüllt. Die Dauer bis zur definitiven Ausheilung beträgt bei der primären Knochenheilung ca. 1,5 bis 2 Jahre. [44]

Sekundäre Knochenheilung Die sekundäre bzw. indirekte Knochenregeneration stellt die natürliche Form dar, bei der die Knochenenden nicht so nah beieinander liegen wie bei der direkten Form. Folglich kann die Spalte nicht direkt von den Osteonen der Knochenenden durchzogen werden und es bildet sich ein Kallus.

Die sekundäre Knochenheilung läuft daher in vier Schritten ab:

1. Bildung des Hämatoms
2. Einwachsen von Fibroblasten und Organisation des Hämatoms
3. Kallusdifferenzierung
4. Anschluss an den alten Lamellenknochen und das Gefäßsystem sowie Abbau der Kallusreste

Die sekundäre Knochenheilung dauert ca. 2 - 3 Jahre. [44] Zunächst infiltrieren undifferenzierte Zellen den Fraktur- bzw. Defektbereich, welche hier proliferieren und schließlich mit Hilfe der freigesetzten Botenstoffe zu Chondroblasten differenzieren. Diese sezernieren extrazelluläre Knorpelmatrix-Bestandteile. Zum Zeitpunkt der Gefäßinvasion kann dann eine Hypertrophie dieser Knorpelzellen beobachtet werden und die Knorpelmatrix wird mineralisiert. Zudem tauchen jetzt auch die ersten Osteoblasten und Osteoklasten im Regenerationsgebiet auf. Im Rahmen des physiologischen Remodellingprozesses wird der Knorpel dann resorbiert und vollständig durch Knochen ersetzt. [109]

1.3 Knochenheilungsstörungen

In den USA liegt die Inzidenz für Frakturen der langen Röhrenknochen bei fast 1,5 Mio pro Jahr, [35] wobei es bei 5 - 10% zu einer gestörten Heilung kommt, [18] bei Patienten mit Risikofaktoren sogar in bis zu 30% der Fälle. [65, 105] Diese Zahlen zeigen die enorme sozioökonomische Bedeutung solcher Verletzungen. [35] Hinzu kommt außerdem noch die Verlängerung der eingeschränkten Lebensqualität des Patienten. [63] So gehen in den USA ca. 146 Mio Krankentage auf Frakturen zurück. [35] Ein weiteres, sozioökonomisch nicht weniger bedeutendes Problem sind Knochendefekte, welche nach ausgedehnten Resektionen von Knochengewebe, sei es nach Tumorresektionen, im Rahmen von Knochenzysten oder nach Osteomyelitiden, zurückbleiben. Auch hier kann die Kontinuität des betroffenen Knochens meist gar nicht oder nur mit großen Schwierigkeiten und nach einem großen zeitlichen Aufwand wieder hergestellt werden.

Knochenheilungsstörungen sind oft nur schwer in den Griff zu bekommen, die Komplikationsrate bei Pseudarthrosen liegt zum Beispiel bei ca. 35% und ist damit mehr als doppelt so hoch wie die durchschnittliche Rate für Komplikationen überhaupt. Hierdurch verlängert sich die Liegezeit der Patienten drastisch, was auch in der Folge die Kosten stark ansteigen lässt. [107]

2006 untersuchten Dahabreh et al. die totalen Kosten für die Behandlung einer Fraktur, die eine Pseudarthrose in Großbritannien verursacht. Sie fanden heraus, dass diese im Schnitt bei £ 21.183,05 lagen. [19]

Geht man einmal davon aus, es liegt der bestmögliche Fall, eine aseptische Pseudarthrose, vor. Sie wird mit dem Standard behandelt, der Patient erhält 3 Dosen Antibiotikum und eine Standard-Thromboembolieprophylaxe. Er benötigt eine minimale Anzahl von ambulanten Kontrollterminen und Physiotherapiesitzungen und ist für 6 Monate krank geschrieben. Außerdem hat der Musterpatient keine weiteren Komplikationen und das funktionelle Ergebnis ist optimal. Die Berechnung der Kosten erfolgte in dieser Studie nach den Preisen von 2008. Hierbei werden bei femoralen Pseudarthrosen Kosten in Höhe von £ 17.200 veranschlagt bzw. £ 16.330 bei tibialen Nonunions. [48]

Aufgrund der steigenden Preisentwicklung ist davon auszugehen, dass sich auch die Kosten für die Behandlung einer Pseudarthrose bis zum heutigen Tag erhöht haben. Aus diesen Gründen ist eine möglichst frühe Diagnose zusammen mit der richtigen und schnellen Therapie, auch aus volkswirtschaftlicher Sicht, enorm wichtig.

Entstehung, Einteilung und Therapie Von einer echten Pseudarthrose oder Nonunion spricht man dann, wenn sechs bis acht Monate nach dem Trauma noch keine knöchernen

Durchbauung vorliegt. Insbesondere in der computertomographischen Untersuchung, aber oft auch im konventionellen Röntgenbild, sieht man dabei die fehlende Konsolidierung. Hiervon abzugrenzen ist eine verzögerte Heilung, bei der eine verspätete knöcherne Überbrückung, vier bis sechs Monate nach dem Trauma, auftritt. Dabei zeigt sich röntgenologisch z.B. ein unscharf abgegrenzter Kallus. [44, 65, 104]

Die Zeichen einer Pseudarthrose oder Nonunion sind in vielseitiger Weise zu erkennen. Zum einen kann klinisch eine Restbeweglichkeit an der Bruchstelle verbleiben, zum anderen sind radiologisch weiterhin bestehende Defektlinien sowie eine hypertrophe oder ausbleibende Kallusbildung erkennbar. [63, 65] Die Symptome, die der Patient wahrnimmt, sind vor allem Schmerzen und die fehlende bzw. im Vergleich zu vorher verminderte Belastbarkeit des Knochens.

Die Ursachen nichtinfizierter Pseudarthrosen sind meist mechanische Instabilität und Durchblutungsstörungen, allerdings können auch fehlende Compliance, starker Nikotinkonsum und Neuropathien zu Nonunions führen. Die Noncompliance des Patienten hat meist zur Folge, dass ein Defekt zu früh zu hohen Belastungen ausgesetzt ist und so eine suffiziente Ruhigstellung nicht gewährleistet wird. Zudem wirkt sich starker Nikotinkonsum negativ auf die Durchblutung aus und verhindert so eine optimale Heilung. Neuropathien, wie im Rahmen von Diabetes mellitus, Alkoholismus, Paraplegie usw., gehen häufig mit einem Verlust der Sensibilität einher, wodurch der Patient nicht wahrnimmt, wie stark er die Extremität belastet. Die folgende Überbeanspruchung kann dann im Verlauf wiederum zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen. [63] Man unterscheidet grundsätzlich zwei Formen von Pseudarthrose: die hypertrophe und die atrophe.

Hypertrophe Nonunions entstehen meist durch mechanische Instabilität bei intakter Durchblutung, sprich vitalen Defektfragmenten. [63, 65] Gründe hierfür können unter anderem die ungenügende Ruhigstellung in der Schiene, Insuffizienz des Osteosynthesematerials oder zu frühe Belastung sein. Der Organismus versucht die fehlende Ruhe herzustellen und den Knochen zu stabilisieren, indem er an den Defektenden verstärkt Knochen bildet, so entsteht der hypertrophe Kallus (siehe Röntgenbild in Abb. 1). Röntgenologisch sieht man die Hypertrophie in Form des „Elefantfußes“ bzw. „Pferdehufes“ (vergleiche Abb. 1) . [63, 64] In einigen Fällen ist diese Form der Nonunion mit Achsabweichungen verbunden, meist leiden die Patienten unter Schmerzen.

Der Therapiestandard besteht hierbei in der Wiederherstellung der Stabilität, entweder durch eine Kompressionsplatte oder durch einen Verriegelungsmarknagel. [63, 65] So wird die Dehnungsbelastung des Gewebes reduziert und es kommt zur Mineralisierung des knorpeligen und fibrösen Gewebes im Pseudarthrosenspalt. Der vorliegende Faserknorpel wird von Gefäßen durchzogen, wodurch Osteoblasten einwandern und den Spalt mit Knochen



Abbildung 1: Hypertrophe Pseudarthrose des Humerus, modifiziert nach [80]

durchbauen. Eine Resektion der hypertrophen Nonunion ist meist kontraindiziert, da es sich um vitalen Knochen handelt, der heilungsfähig ist. Eine Ausnahme besteht jedoch bei ausgeprägten Achsabweichungen. [63]

Bei der *atropen* Pseudarthrose (siehe Abb. 2) liegt die Ätiologie meist in der fehlenden bzw. mangelhaften Perfusion, genauso kann aber auch eine nicht ausreichende Osteoinduktion die Ursache sein. Bei der avaskulären Form unterliegen die nekrotischen Defektenden einer immer weitergehenden Resorption, was unweigerlich zu einem Substanzverlust mit Verkürzung des Knochens führt. Des weiteren werden die Knochenanteile distal des Defekts weniger belastet, was eine Inaktivitätsosteopenie zur Folge haben kann. Insbesondere an der oberen Extremität zeigt die atrophe Pseudarthrose auch eine gewisse Durchblutung. Hier kommt es durch eine fehlende Beanspruchung zur Atrophie. [63, 65]



Abbildung 2: Atrophe Pseudarthrose des Femur nach Versorgung mit einem Marknagel, modifiziert nach [59]

Die Behandlungsstrategie der avaskulären Pseudarthrose besteht in einer Verkürzung des betroffenen Knochens, evtl. kombiniert mit einer defektfernen Kallusdistraction zur gleichzeitigen Verlängerung der betroffenen Seite oder gleichzeitigen Verkürzung der

Gegenseite. Eine weitere Option stellt die Tibia-pro-Fibula-Operation oder die Einbringung von anderen Transplantaten dar. Der empfohlene Standard ist hierbei autologer Knochen (zumeist ein Fragment aus dem Beckenkamm). Liegt der Fall einer atrophischen Pseudarthrose mit vitalen Fragmenten vor, so ist die Osteoinduktion zu unterstützen. Dies kann durch autogenen Knochen oder pharmazeutische Produkte erreicht werden. [63]

Die *synoviale* Nonunion ist eine echte Pseudarthrose. Sie entsteht durch andauernde Bewegung der Bruchfragmente gegeneinander, dadurch bildet sich eine Gelenkhöhle mit Synovia. Häufig kommt es bei dieser Form zu Achsfehlstellungen. Die Behandlung erfolgt durch Débridement der Synovialhaut mit anschließender Dekortikation der Defektenden und Korrektur der Deformation. Stabilisiert wird der Defekt in den meisten Fällen durch ein Knochentransplantat.

Von den genannten, nicht infizierten Falschgelenken sind die *infizierten Pseudarthrosen* klar abzugrenzen. Die häufigsten Erreger infizierter Pseudarthrosen sind *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, welche zu einer persistierenden Entzündung führen können, die durch Antibiotika allein nicht in den Griff zu bekommen ist. Die Therapie in diesem Fall besteht in der großzügigen Entfernung des infizierten Materials sowie einer systemischen und gegebenenfalls lokalen Antibiotikatherapie. [63]

1.4 Therapie von Knochendefekten mit Heilungsstörung

Bei *hypertrophen Pseudarthrosen* steht die Stabilisierung des Defekts an erster Stelle. Hierzu eignen sich sowohl Plattenosteosynthesen als auch verschiedene Nagelsysteme. [33, 63, 64] Die effektivste Methode zur Freilegung des Defekts stellt die Dekortikation dar, ohne hinzukommende Beschädigung des Gefäßsystems. Außerdem gibt sie einen weiteren Reiz zur Osteosynthese. [33, 63] Wichtig ist die ausreichende Gewebeentfernung sowie eine gute Stabilisierung durch den Operateur, da es sonst zu keiner Ausheilung kommt. [33]

Oft wird die Dekortikation mit einer autologen Spongiosaplastik kombiniert, welche einen nekrotischen Knochenabschnitt überbrücken kann und sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv wirkt. [63, 65] Hierbei kommt es allerdings häufig zu Beschwerden an der Entnahmestelle (oft Beckenkamm), wie Schmerzen, Gefäßverletzungen oder Taubheitsgefühl im Bereich der Narbe. Einige Patienten klagen sogar länger über Schmerzen am Beckenkamm als an der früheren Pseudarthrose. [23, 108]

Überschreitet der Defekt eine Größe von 3 - 4cm, so führt man einen Segmenttransport mittels Kallusdistraction oder Fixateur-externe (z.B. nach Ilizarov) durch. [65]

Bei der Behandlung der *atrophen Pseudarthrosen* steht die Wiederherstellung der Durchblutung sowie die Stimulation der Osteogenese im Mittelpunkt. Dabei ist die Resektion der Defektenden obligat. [65] Neben der Stabilisierung wird hier ein autologes Spongiosatransplantat eingebracht, welches die Osteogenese anregen soll. [33, 64] Des Weiteren ist es möglich das Knochenwachstum mit Hilfe von extrakorporalen Stoßwellen anzuregen. [82]

Die Therapie der *infizierten Pseudarthrosen* erfolgt in erster Linie durch eine Infektsanierung mittels Débridement einschließlich der angrenzenden Weichteile und durch eine konsequente systemische Antibiotikagabe. In der zweiten Phase kann dann eine erneute Stabilisierung kombiniert mit einer Spongioplastik durchgeführt werden. [33, 65, 63] Eine weitere Möglichkeit bei der Therapie von Pseudarthrosen der Tibia besteht in der Durchführung einer Fibula-pro-Tibia-Operation. Hierbei wird nach der Infektsanierung eine breite Verbindung zwischen Fibula und Tibia aus Knochen eingefügt. Zu Erwähnen ist in diesem Zusammenhang auch noch die Verschiebeosteotomie, die man bei einem großen Knochenverlust durchführt. [33, 63]

1.4.1 Autograft

Unter den autologen Knochenersatzmaterialien stellt die autologe Spongiosaplastik den „Goldstandard“ dar. Sie zeigt zum einen ein gutes Einbauverhalten und wirkt gleichzeitig osteoinduktiv. Ein großer Nachteil ist allerdings die stark begrenzte Menge sowie die zusätzlichen Komplikationen auf Grund des zweiten Eingriffs. Des Weiteren verlängert

sich so die Operationszeit, womit sich auch die Kosten erhöhen. [71]

Vinken et al. untersuchten 2003 die Kosten für eine Applikation von BMP-7, die Fixation nach Ilizarov und die Transplantation von autologem Knochengewebe im Vereinigten Königreich und in Deutschland. Dabei zeigte sich, dass in Deutschland für eine Therapie mit BMP-7 Kosten in Höhe von £ 15.156, für eine Transplantation von autologem Knochengewebe £ 14.348 und für die Behandlung nach Ilizarov £ 15.361 anfielen. [102]

1.4.2 Allograft

Eine weitere Möglichkeit verloren gegangenes Knochenmaterial zu ersetzen sind Allografts. Hierbei unterscheidet man spongiöse und massive bzw. strukturelle Transplantate. Letztere verwendet man vor allem bei komplexen Rekonstruktionen. Es handelt sich dabei meist um Femurköpfe, welche im Rahmen von Endoprothesenimplantationen entnommen wurden. Sie werden mit Hitze behandelt und dann bei -80°C gelagert, was dazu führt, dass einerseits die Zellen, andererseits aber auch die Wachstumsfaktoren zerstört werden. Somit ist dieses Implantat nicht mehr osteoinduktiv. Des weiteren kann es trotz des Auskochens zu Immunreaktionen im Empfänger kommen. Allografts werden aber auch im Rahmen von Endoprothesenwechseln und bei Knorpelknochendefekten eingesetzt. Weitere Anwendungsgebiete liegen im Ersatz von Knochen nach Tumorresektionen sowie bei periprothetischen Frakturen. Ein Problem der massiven Allografts stellt der mangelhafte Einbau dar, denn durch die Größe und Avitalität des Transplantats kommt es nur oberflächlich zu einer Verbindung mit dem umliegenden Knochengewebe. Außerdem steigt nach Implantation eines Allografts die Infektionsrate um bis zu 14%. Auch kommt es in bis zu einem Drittel der Fälle zur Resorption der Grafts mit anschließender Nonunion und erneuter Fraktur. Zu Bedenken ist, dass die Allografts zum Zeitpunkt der Implantation nicht vital sind, was zur Folge hat, dass der eigentliche Einbau der Implantate erst nach einer Zeit des Remodellings beginnt. So kommt es zu einer Verminderung der biomechanischen Stabilität. Weitere Probleme liegen im regional unterschiedlichen Anfallen solcher Präparate und im hohen Preis für einen Hüftkopf.

Grundsätzlich ist es auch möglich xenogene Transplantate als Defektfüller zu verwenden, allerdings ist hierbei eine zeit- und kostenintensive Aufbereitung notwendig, um die Immunogenität zu verringern. Als Beispiel seien hier bovine Transplantate genannt, welche in großer Menge zur Verfügung stehen. Ein weiterer Nachteil ist die verzögerte Resorption, auf Grund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften. [71]

1.4.3 Bone morphogenetic proteins

Historie Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die zur TGF- β -Superfamilie gehören. [16, 21, 85] Entdeckt wurden sie 1965 von Urist et al.. Er zeigte in seinen Experimenten, dass dekalzifizierter Knochen, welcher in Muskel implantiert wurde, zur Bildung von Knochen an dieser Stelle führt. [16, 21, 85, 100, 112] Später nannte er die Faktoren, welche für dieses Phänomen verantwortlich waren, Bone morphogenetic proteins. [21] Bis heute zählen etwa 20 Proteine zur BMP-Familie. [112] 1988 gelang es Wozney et al. zum ersten Mal BMPs zu isolieren und ihre cDNA herzustellen. [85]

Molekülstruktur BMPs werden im Organismus als Vorläufer produziert und unterlaufen dann einen Reifeprozess. Jedes Molekül besitzt ein 50 - 100 Aminosäuren langes, hydrophobes Ende. Des weiteren enthalten sie sieben Cysteine, von denen sechs einen Cysteinknoten bilden, wobei das letzte Cystein im Zuge der Dimerisierung von Bedeutung ist (siehe Abb. 3).

Grundsätzlich bestehen BMPs aus einem Signalpeptid, einer Pro-Domäne und dem reifen Protein (siehe Abb. 3, Teil A). Während des Reifeprozesses wird zunächst das Signalpeptid abgetrennt, sodass das aktive C-terminale Ende freiliegt. Anschließend wird das Peptid glycosyliert und lagert sich mit einem zweiten Molekül zu einem Dimer zusammen. Bei der Sekretion des reifen BMPs verliert dieses dann noch seine Pro-Domäne und wird so aktiviert. [85, 109, 111, 112]

Funktionen in der Knochenregeneration BMPs spielen eine entscheidende Rolle in der Bildung von Knochen und Knorpel. [62, 112] So ist zum Beispiel bekannt, dass BMP-2, -3, -4, -5, -6 und -7 in Wachstumsfugen exprimiert werden. [52] Man geht davon aus, dass BMPs die Differenzierung von Osteoblasten anregen. [27, 110] Die Bildung vieler extrazellulärer Proteine, wie Kollagen, Osteocalcin und alkalische Phosphatase wird außerdem durch BMPs gesteuert. [106]

Des weiteren sind BMPs an diversen Prozessen in der Entwicklung beteiligt. Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Wachstumsfaktoren große Ähnlichkeit mit den Proteinen *vegetalising factor-1* (Vg1) und *Decapentaplegic* (dpp) aufweisen, welche an vielen Vorgängen während der Embryogenese in *Xenopus laevis* bzw. *Drosophila melanogaster* beteiligt sind. [109] Einen Überblick hierzu gibt Tabelle 1.4.3.

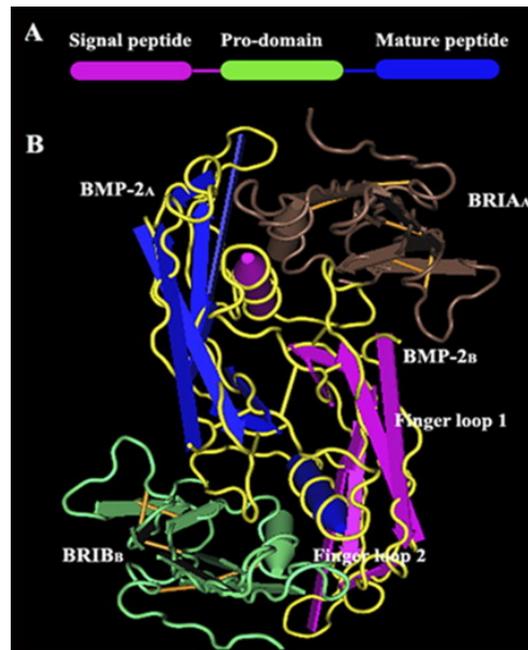


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Molekülstruktur von BMP-2 [112]

Klinischer Einsatz Im klinischen Einsatz befinden sich derzeit nur die rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren BMP-2 und -7 (rhBMP-2 und -7). Der Einsatz von rhBMP-7 (Osigraft[®] von Stryker, Opgenra[®] von Olympus Biotech International Limited) ist in Deutschland noch keine gängige Therapieoption. Was vermutlich daran liegt, dass dieses Medikament erst recht spät eine Zulassung erhielt, welche den Gebrauch stark einschränkt. Aufgrund der Tatsache, dass die Zulassungsstudie rhBMP-7-Implantationen in Tibiafrakturen untersuchte, beschränkte man die Zulassung in Deutschland hierauf. Außerdem müssen vorher schon eine Reihe erfolgloser Behandlungen durchgeführt worden sein, sodass rhBMP-7 nur bei therapieresistenten Patienten zum Einsatz kommt. In anderen Ländern, wie z.B. den USA und Australien, ist der Einsatz an allen langen Röhrenknochen zulässig. In Deutschland ist ein Einsatz außerhalb der Tibia nur im Rahmen eines sogenannten „off label use“ möglich. Hierbei müssen diverse Kriterien, wie eine schwerwiegende lebensbedrohliche Erkrankung, eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, keine Alternativtherapien und die Wirksamkeit des Medikaments, erfüllt sein.

2006 veröffentlichten Zimmermann et al. eine Studie in der 23 Implantationen von rhBMP-7 bei Pseudarthrosen langer Röhrenknochen untersucht wurden. Das Patientenkollektiv bestand aus „austherapierten“ Patienten, die mehrfach voroperiert waren. Nach Implantation von rhBMP-7 (Osigraft[®]), kam es in 22 Fällen zur Ausheilung der Fraktur innerhalb von wenigen Monaten. Postoperative Komplikationen traten hierbei nicht auf [115].

2007 veröffentlichte der gleiche Autor eine neue Untersuchung, bei der es darum ging, die

BMP	Funktion
BMP-1	Metalloprotease; beteiligt an der Knorpelbildung
BMP-2	Homodimer; induziert Knochen- und Knorpelbildung; Osteoblastendifferenzierung
BMP-3	induziert Knochenbildung
BMP-4	reguliert Zahn-, Extremitäten- und Knochenbildung aus Mesoderm; Frakturheilung
BMP-5	Knorpelbildung
BMP-6	Frakturheilung
BMP-7	Schlüsselrolle in Osteoblastendifferenzierung; induziert Bildung von SMAD-1; Nierenentwicklung
BMP-8	beteiligt an Knochen- und Knorpelentwicklung
BMP-9	Steuerung der Entwicklung von Chondrozyten aus mesenchymalen Stammzellen
BMP-10	Trabekelentwicklung des embryonalen Herzens
BMP-15	evtl. Oozyten- und Follikelentwicklung

Tabelle 1: Übersicht über die Funktionen verschiedener BMPs [112]

Effizienz der primären Spongiosaplastik im Vergleich zu einer Behandlung mit rhBMP-7 zu bestimmen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Osigraft[®] eine mindestens genauso hohe Wirksamkeit zur Ausheilung besitzt wie der bisherige Standard Spongiosaplastik. [116]

Eine bedeutende Studie für die Zulassung von rhBMP-7 als Medikament stammt von Friedlaender et al. (2001). Er untersuchte 122 Patienten, die entweder ein autologes Knochentransplantat oder ein rhBMP-7-Implantat erhielten. Nach 1, 2, 3, 6, 9, 12 und 24 Monaten wurde nach Schmerzen an der Frakturstelle gefragt und die Belastbarkeit der betroffenen Extremität untersucht. Bei Patienten nach autologer Knochentransplantation wurde zusätzlich nach Beschwerden an der Entnahmestelle gefragt. Festgestellt wurde, dass bei Transplantation von Knochen die OP- und Liegezeiten der Patienten länger waren. Außerdem erlitten sie im Schnitt einen höheren Blutverlust. Die Komplikationsrate war in beiden Gruppen gleich. Letzten Endes zeigte sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Vergleichsgruppe eine Erfolgsrate von 82% nach 24 Monaten. So konnte gezeigt werden, dass rhBMP-7 eine klinisch sichere Therapiemöglichkeit darstellt. [35]

Bemängelt wurde bei all diesen Untersuchungen die Dosis des eingebrachten Wachstumsfaktors, welche deutlich über der physiologisch vorhandenen Menge im Frakturbereich liegt. [98] Die physiologische Dosis, bei der eine Antwort erzeugt wird, liegt bei Menschen bei etwa $800\mu\text{g}/\text{ml}$. [106] Grund hierfür ist die sehr kurze Halbwertszeit der Proteine. [96] Hierdurch wird vor allem das Risiko für heterotope Ossifikationen gesteigert. Außerdem besteht ein Risiko für allergische Reaktionen durch das aus bovinem Knochen gewonnene

Kollagen Typ I, welches in Osigraft[®] enthalten ist. Hinzu kommt, dass die Wirksamkeit des Wachstumsfaktors durch den Carrier maßgeblich beeinflusst wird. [98] Man hat bislang aber noch kein ideales Transportsystem gefunden.

Osigraft[®] von Olympus Biotech International Limited enthält 3,3mg rhBMP-7 (Eptotermin alpha), welches durch rekombinante DNA-Technologie in Zellen aus Eierstöcken des chinesischen Hamsters produziert wird. Das Pulver dient der Herstellung einer Suspension. Anzuwenden ist dieses Medikament bei traumatisch bedingten Pseudarthrosen der Tibia, die mindestens neun Monate bestehen und bei denen eine vorangegangene Therapie mit autologer Spongiosa fehlgeschlagen ist bzw. nicht möglich war. Eine weitere Bedingung für die Anwendung dieses Produkts ist ein ausgewachsenes Skelett beim Patienten. Der Nachteil dieser Therapiestrategie ist zum einen der Preis von Osigraft[®] und zum anderen die große Menge an Wachstumsfaktor, die in die Fraktur eingebracht werden muss. Dadurch kommt es leichter zu Verschleppungen des osteoinduktiven Materials und so zu heterotoper Knochenbildung. Des Weiteren kann es zu allergischen Reaktionen gegen das rekombinant hergestellte BMP oder andere Bestandteile des Pulvers kommen. [93] Ein weiteres Medikament, welches ebenfalls als Pulver zur Herstellung einer Suspension vertrieben wird und als Wirkstoff auch 3,3mg Eptotermin alpha enthält, ist Opgenra[®], ebenfalls von der Firma Olympus Biotech International Limited. Die Anwendung von Opgenra[®] wurde von der European Medicines Agency (EMA) auf die Behandlung der Spondylolisthesis beschränkt. Als häufige Nebenwirkungen werden postoperative Infektionen, Wundheilungsstörungen und heterotope Ossifikationen angegeben. [30]

Rekombinantes humanes BMP-2 (Dibotermin alpha) wird von der Firma Medtronic BioPharma B.V. produziert und nennt sich InductOs[®]. Es enthält 12mg des Wachstumsfaktors und wird ebenfalls als Pulver hergestellt. Zugelassen ist dieses Medizinprodukt zur ergänzenden Therapie bei Tibiafrakturen sowie zur Fusion von Lendenwirbelkörpern bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen. Nachteil ist, wie auch bei der Anwendung von Osigraft[®], dass es bei hohen Dosen zu exzessiver Kallusbildung kommen kann, welche dem Patienten im Folgenden weitere Beschwerden bereitet. Als weitere häufige Nebenwirkung sind auch hier postoperative Infektionen und Wundheilungsstörungen zu nennen. [28] Außerdem kann es auch bei InductOs[®] zu allergischen Reaktionen gegen das rekombinante Protein sowie gegen andere Bestandteile des Medikaments kommen. [43, 74] Des Weiteren konnten zwei Metaanalysen 2013 keinen Vorteil in der Fusion von Wirbelkörpern mit InductOs[®] gegenüber autologem Knochen feststellen. [36, 86] Eine dieser Studien konnte außerdem ein signifikant höheres Risiko für Krebserkrankungen nach einer Behandlung mit InductOs[®] feststellen, wobei die Gesamtzahl der Krebserkrankungen gering war und die Tumoren sehr unterschiedlich. [36]

Wirtschaftliche Aspekte Vergleicht man einmal die Kosten für eine Therapie mit einer Knochentransplantation mit den Kosten für eine Behandlung mit rhBMP-7, so wird ersichtlich, dass die zweite Option zwar teurer ist, dies aber nur auf die Kosten für den Wachstumsfaktor zurückzuführen ist. In fast allen anderen Punkten, wie Liegezeit, radiologische Nachuntersuchungen und ambulante Vorstellungen, sind die Kosten in der mit rhBMP-7 behandelten Gruppe deutlich geringer. So kam es, dass am Ende eine solche Therapie nur £ 463,37 teurer war als eine Knochentransplantation, obwohl der Preis für das Protein bei £ 3.002,20 lag. [18]

Jones et al. veröffentlichten 2004 die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der er den Nutzen von rhBMP-2 in der Behandlung von offenen Tibiaschaftfrakturen analysierte. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass aus Sicht des Kostenträgers die direkten Kosten für zwei Jahre bei einem Patienten, welcher mit einem intramedullären Marknagel und rhBMP-2 therapiert wurde, bei £ 16.734 lagen, wohingegen ein Patient, der nur einen Marknagel bekam, £ 20.217 kostete. [47] Zurückzuführen ist dies auf eine verringerte Komplikationsrate, ein vermindertes Infektionsrisiko und eine schnellere Frakturheilung in der mit rhBMP-2 behandelten Gruppe. [95]

1.4.4 Gentransfer

Mit Hilfe der Gentherapie können einige der Probleme, welche sich aus der Anwendung rekombinanter BMPs ergeben, gelöst werden. Durch Einbringen der genetischen Information des Wachstumsfaktors in das Genom von autologen Zellen kann das Einführen körperfremden Materials vermieden werden. Des weiteren liegen so wesentlich geringere Mengen BMP im Frakturspalt vor, was die Gefahr der überschießenden Kallusbildung reduziert. Das Prinzip der Gentherapie besteht darin, die genetische Information für ein Protein in den Organismus einzubringen, sodass dieser das gewünschte Eiweiß selbst produziert. Hierzu benötigt man ein Transportsystem, welches in die Zelle eindringt und die Information in den Zellkern transferiert, wo sie entweder in die DNA des Organismus integriert wird oder als Episom verbleibt. Grundsätzlich unterscheidet man virale (z.B. Adenoviren und Lentiviren) und nicht-virale Vektoren (z.B. Elektroporation). [70] Nicht-virale Transportsysteme sind verhältnismäßig einfach zu handhaben und kostengünstig. Allerdings ist die Transfektionsrate sehr niedrig, das heißt nur wenig genetische Information erreicht ihr Ziel. In der Folge kann dann oft auch keine ausreichende Menge Protein gebildet werden. Ein Beispiel für ein nicht-virales Verfahren ist die Elektroporation. Hierbei werden mit Hilfe von elektrischem Strom Löcher in die Zellmembran eingebracht, wodurch die genetische Information eindringen kann. Ein Nachteil dieser Methode ist die gezielte Zerstörung der Zelle, welche im Nachhinein wieder repariert werden muss. Geschieht dies nicht geht

die Zelle zu Grunde. Bei einem anderen Verfahren wird die DNA in Liposome verpackt, welche anschließend von der Zielzelle aufgenommen werden. In der Entwicklung sind derzeit außerdem verschiedene chemische Methoden. [8, 50]

Eine deutlich bessere Effektivität bezüglich der Transduktionsrate weisen virale Transportsysteme auf. Hierfür werden verschiedene Vektoren verwendet. Die gängigsten Viren sind Adenoviren, Retroviren, Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren. Adeno-assoziierte Viren sind non-patho- und non-immunogene rekombinante Viren, welche ihr Erbgut nicht in das der Wirtszelle integrieren. Jedoch ist ihre Herstellung aufwendig und kostenintensiv. Lenti- und Retroviren bringen ihre Nukleinsäuren in das Genom der Zielzelle ein, woraus eine langfristige Expression der Information bis zum Zelltod resultiert. [94] Inzwischen gibt es auch modifizierte Formen, welche einen eingebauten Promotor besitzen, der z.B. durch Tetracyclin aktiviert bzw. gehemmt werden kann. Auf diese Weise ist eine Steuerung der Expression durch den Arzt möglich. [8] Adenoviren werden häufig als Transporter genutzt. Sie integrieren ihr Erbgut nicht in das Wirtsgenom, wodurch das Gen für zwei bis drei Wochen exprimiert wird und die Produktion nach spätestens sechs Wochen komplett zum Erliegen kommt. [1, 15] So kann im Zusammenhang mit der Knochenheilung das Risiko für eine überschießende Kallusbildung minimiert werden. [8]

Zu den Zielgenen, die man im Rahmen der Knochenregeneration ansprechen möchte, gehören Faktoren, welche die Knochenheilung unterstützen, wie BMPs, TGF- β , Insulin-like Growth Factors (IGFs), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Latent Membrane Protein 1 (LMP-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), constitutively active BMP type I Receptor ALK2 (caALK2) und viele andere. Sie regen die Einwanderung, Proliferation und Differenzierung der für die Heilung essenziellen Zellen an. So bewirkt z.B. VEGF die Einsprossung von Gefäßen in den Frakturspalt, FGFs verbessern die Migration, Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen und BMPs steuern die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten. [8]

Bei der Gentherapie unterscheidet man grundsätzlich zwei Formen. Zum einen gibt es die in-vivo Gentherapie, bei der man den Vektor direkt in den Organismus einbringt, und zum anderen gibt es die ex-vivo Methode, bei der Zellen aus dem Körper entnommen, im Labor manipuliert und anschließend wieder reimplantiert werden. Bei der in-vivo Methode kann die Knochenbildung an spezifischen Stellen im Körper direkt induziert werden, wodurch der Aufwand deutlich reduziert wird. [7, 9, 8] Allerdings besteht hierbei das Risiko einer Immunantwort auf den Vektor. [67] Genau dort liegen die Vorteile des ex-vivo Gentransfers, bei dem der Vektor gar nicht erst in den Organismus eingebracht wird, sondern nur die manipulierten autologen Zellen. Liebermann et al. zeigten 2002, dass Knochen, dessen Bildung durch BMP-2-exprimierende Zellen induziert wurde, sogar robuster ist als solcher, welcher durch rhBMP-2 gebildet wurde. [57] Nachteil beim ex-vivo Transfer ist

die erforderliche Isolation und Kultivierung der Zellen im Labor. Daher ist diese Methode relativ mühsam, zeitaufwendig und teuer, aber eben auch sicherer und effektiver.

Ziel ist es also, das im Grunde sehr gut geeignete Verfahren des ex-vivo Gentransfers zu vereinfachen und zu beschleunigen. Entwickelt wurde dieser beschleunigte ex-vivo Gentransfer von Betz et al.. Hierbei sind keine Isolation und Langzeitkultivierung von Nöten. Die Markergenexpression blieb in den ersten Testungen für einige Wochen bestehen. Gewebetransplantate mit AdBMP-2 in Rattenfemora zeigten eine komplette Durchbauung mit Bildung von Neo-Kortex nach acht Wochen. [8]

Als Zellreservoir, in welches man das Fremdgen einbringen kann, eignet sich für die Knochenregeneration sehr gut Fettgewebe. Dieses enthält eine große Zahl an Stammzellen, welche zu Knochenzellen differenzieren können. Es bietet außerdem die Vorteile der minimalen Morbidität an der Entnahmestelle und der einfachen Gewinnung. [20, 34, 55, 92]

Das Potenzial für einen beschleunigten Gentransfer in der Klinik ist groß, da so, wie oben bereits beschrieben, die OP-Zeiten, Liegezeiten und folglich die Kosten deutlich reduziert werden könnten.

1.5 Fragestellung und Aufgaben

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung einer schnellen und effizienten Methode zur Therapie großer segmentaler Knochendefekte mit genaktiviertem Fettgewebe. Die Modifikation der Gewebefragmente wird dabei mit cDNA des Wachstumsfaktors BMP-6 durchgeführt, welche mittels eines adenoviralen Vektors in die Zielzellen eingebracht wird. Die Untersuchung wird in einem etablierten Knochendefektmodell (Fischer 344 Ratten) vorgenommen, wobei die mechanische Stabilität als Hauptzielgröße, bei der Beurteilung des Erfolgs angesehen wird. Nebengröße ist die Menge des gebildeten Knochens, welche im Rahmen der MicroCT- bzw. der histomorphometrischen Untersuchung ermittelt wird. Anhand dieser Beurteilungskriterien für die Qualität des neugebildeten Knochens ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist es möglich einen kritischen Knochendefekt mit Hilfe von Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe zu überbrücken?
2. Ist der durch Ad.BMP-6 aktivierte Knochentyp hinsichtlich seiner biomechanischen, CT-morphologischen und histologischen Eigenschaften mit gesundem Knochen vergleichbar?
3. In welcher Zeitspanne erfolgt die Durchbauung eines kritischen Knochendefekts durch die Therapie mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in der vorgestellten Studie verwendeten Materialien, Geräte und Instrumente stammen aus dem Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der LMU und sind dort bereits etabliert. Der Umgang erfolgt nach den aktuellen Sicherheitsvorschriften. Eine ausführliche Liste aller verwendeter Verbrauchsmaterialien, Geräte, Instrumente und Computerprogramme befindet sich im Anhang.

2.2 Methoden

2.2.1 Vektor

Der in dieser Studie verwendete Vektor ist ein Adenovirusvektor der Firma Sirion (AdSir). Die Transkriptionseinheit liegt hierbei in der E1 Region. AdSir ist ein humanes Adenovirus des Serotyp 5, es enthält die adenoviralen Sequenzen nt 1-448 und 3511-35935. Die E3 Region ist komplett deletiert (nt 28598-30470 bezüglich Ad5 wt). Eine detaillierte Vektorkarte stellt Abb. 4 dar.

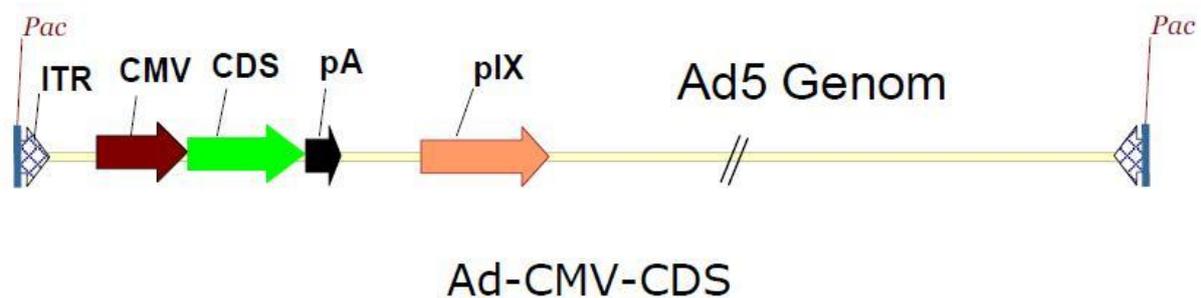


Abbildung 4: Vektorkarte [87]

Zur Klonierung von pAd-CMV-CDS wird zunächst eine Transkriptionskassette aus dem CMV-Promotor, dem kodierenden Bereich von CDS und dem Polyadenylierungssignal (pA Sv40) in ein Shuttleplasmid kloniert. Danach wird dieses mit einem BAC-Vektor, welcher ein E1/E3-deletiertes AV5 Genom enthält, rekombiniert. So entsteht der Expressionsvektor pAd-CMV-CDS. Im Anschluss hieran erfolgt durch Restriktion des BAC-Gens mit Hilfe von PacI, die Freisetzung des viralen Genoms. Durch Transduktion von HEK 293-Zellen werden anschließend intakte adenovirale Partikel gewonnen. [87]

Amplifikation Zur Vermehrung des adenoviralen Vektors, der das Gen für BMP-6 enthält, werden HEK 293-Zellen mit dem Virus transduziert. So produzieren diese Zellen den Vektor, welcher nach Lyse des Wirts freigesetzt wird und in aufgereinigter Form für den weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden kann.

Hierzu werden die bereits erwähnten HEK 293-Zellen zunächst in Zellkulturflaschen mit Amplifikationsmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) ausgesät und vermehrt. Die Inkubation erfolgt für vier Tage bei 37°C und 5% CO₂, wobei nach einem Tag ein Medienwechsel erfolgt. Im Anschluss werden die Zellen geerntet, woraufhin aus ihnen eine Zellsuspension hergestellt wird.

Zehn Petrischalen werden mit *20ml* Amplifikationsmedium und jeweils *2ml* Zellsuspension bestückt. Daraufhin werden die Schalen bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ für vier Tage inkubiert. Nach diesem Zeitraum beträgt die Konflueszenz ca. 60% , was mit Hilfe eines Mikroskops abgeschätzt wird. Nun können die Zellen mit dem Adenovirus infiziert werden. Hierzu werden $20\mu\text{l}$ virushaltige Lösung mit *20ml* Transduktionsmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) für jede Platte gemischt. Das alte Medium von den Petrischalen wird verworfen und das Medium-Virus-Gemisch auf jede Platte gegeben. Anschließend erfolgt die erneute Inkubation bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ für drei Tage.

Im Anschluss werden die Zellen geerntet und lysiert, sodass der produzierte Vektor freigesetzt wird. Die Aufreinigung erfolgt bei Sirion Biotech München.

2.2.2 Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Der Name Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem eine Enzym-vermittelte Farbreaktion photometrisch gemessen wird. In dieser Arbeit wurde dieser Test verwendet, um die Menge des von den genaktivierten Fettzellen produzierten BMP-6 zu bestimmen.

Gewinnung der Proben Zur Gewinnung des Probenmaterials wird ein Tier euthanasiert und ihm im Verlauf unter sterilen Bedingungen Fettgewebe entnommen. Dieses wird dann auf die Wells einer 24-Well-Platte verteilt und mit dem Vektor transduziert (siehe auch Kapitel 2.2.5). Zum Schluss wird auf jedes Well 800 μ l Standardmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) gegeben, welches im weiteren Verlauf für zwölf Wochen alle drei Tage gewechselt wird. Die Überstände von jedem Medienwechsel werden bei -20°C eingefroren und dienen im Verlauf als Testmaterial für den ELISA.

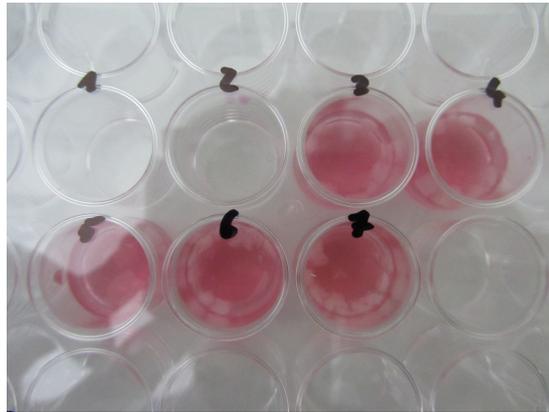


Abbildung 5: Fünf Wells mit transduzierten Fettgewebstückchen

Ablauf Für den ELISA wurde das RayBio[®] ELISA-Kit Human BMP-6 von RayBiotech, Inc. verwendet (Versuchsprotokoll siehe Anhang). Zu dessen Inhalt gehört unter anderem eine 96-Well-Platte, auf deren Oberfläche ein Antikörper gegen das gewünschte Protein fixiert ist. Kommt dieser Antikörper mit BMP-6 in Kontakt, so bindet er das Protein und fixiert es auf der Platte.

Um die Menge an BMP-6 zu bestimmen, werden auf jedes Well 100 μ l der Probe aufgetragen. Nach 2,5 Stunden Inkubationszeit werden die Überstände entfernt und auf jedes Well 100 μ l Anti-BMP-6-Antikörper aufgetragen. Dieser ist zusätzlich an einen Farbstoff gekoppelt, welcher durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden kann. Neben den

Proben wird außerdem die Verdünnungsreihe eines Standards getestet, so kann man durch eine photometrische Messung dann die Menge des Proteins bestimmen. Die Wellenlänge des Lichts bei der Photometrie beträgt für diesen Versuch 450nm.

2.2.3 Defektmodell und Gruppeneinteilung

Genehmigt wurde dieses Versuchsvorhaben durch die Regierung von Oberbayern im Sinne von § 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG). Die Eingriffe wurden am Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum auf höchstem Behandlungsstandard gemäß des Tierschutzgesetzes (TierSchG) ordnungsgemäß durchgeführt.

Die in dieser Studie verwendeten Tiere wurden im Stall des Instituts für Chirurgische Forschung in Käfigen von je zwei Tieren gehalten. Sie bekamen Futter und Wasser ad libitum und konnten sich jederzeit im Käfig frei bewegen. Der Stall wurde dem Standard entsprechend klimatisiert ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ Raumtemperatur, 45 - 60% relative Luftfeuchte, 12 h Hell-dunkel-Rhythmus). Im Käfig befand sich eine Standardstreu für Ratten, wobei zweimal pro Woche der Käfig gereinigt wurde. Zutritt zur Anlage hatte nur autorisiertes Personal, welches zum Betreten der Haltungs- und Operationsräume hohe Hygienevorgaben (u.a. Anlegen von spezieller Schutzkleidung) einhalten musste. Die artgerechte Pflege wurde von ausgebildeten Tierpflegern/Tierpflegerinnen (§ 11, Abs. 1, Satz 2, Nr. 2, TierSchG) in den speziell für Tierhaltung zugelassenen Räumen (§ 11, Abs. 1, Satz 2, Nr. 3, TierSchG) vorgenommen.

Defektmodell Als Modell werden in dieser Arbeit Fischer 344 Ratten der Firma Charles River, Sulzfeld, verwendet. Da diese Tiere durch spezielle Kreuzung annähernd genetisch identisch sind, kann zu Beginn einer Operationsserie ein Tier euthanasiert und als Gewebespender für die Tiere der nachfolgenden Versuchsreihe verwendet werden. Die Ratten sind zum Zeitpunkt der OP zwölf Wochen alt und somit skeletal reif. Ihr Gewicht beträgt ca. 275g.

In das rechte Femur wird ein 5mm großer Defekt mit einer Kugelfräse eingebracht, der im Anschluss je nach Gruppenzugehörigkeit behandelt wird.

Gruppeneinteilung Das statistische Gutachten zum Tierschutzantrag wurde vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der medizinischen Fakultät der LMU durchgeführt.

Es werden zwei Beobachtungszeitpunkte gewählt, nach sechs und nach zwölf Wochen, wobei es jeweils drei Gruppen gibt. Zum einen unbehandelte Defekte, bei denen ein Knochendefekt gesetzt wird, welcher unbehandelt bleibt. So soll gezeigt werden, dass es sich in dem hier verwendeten Modell um einen kritischen Defekt handelt, welcher ohne Therapie nicht verheilt. Diese Gruppe wurde ausschließlich zwölf Wochen beobachtet, da davon auszugehen ist, dass wenn nach zwölf Wochen kein Knochenwachstum festzustellen ist, dies nach sechs Wochen auch nicht festzustellen wäre. Des weiteren gibt es eine Gruppe,

bei der der Defekt mit nicht modifiziertem Fettgewebe eines Spendertieres gefüllt wird. Die dritte Gruppe erhält eine Behandlung mit dem Ad.BMP-6 aktivierten Fettgewebe. Insgesamt werden somit 53 Tiere operiert und entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit versorgt. Pro Versuchsgruppe wird darüber hinaus jeweils ein Spendertier benötigt, wodurch eine Gesamtzahl von 63 Ratten zustande kommt. Eine Übersicht über die Gruppenaufteilung zeigen Tabelle 2 und 3 jeweils für das MicroCT und die Biomechanik bzw. für die histologische Auswertung.

6 WOCHEN		8x nicht modifiziertes Fettgewebe	7x Ad.BMP-6 aktiviertes Fettgewebe
12 WOCHEN	8x unbehandelte Defekte	8x nicht modifiziertes Fettgewebe	7x Ad.BMP-6 aktiviertes Fettgewebe

Tabelle 2: Versuchsgruppen MicroCT und Biomechanik

6 WOCHEN		3x nicht modifiziertes Fettgewebe	3x Ad.BMP-6 aktiviertes Fettgewebe
12 WOCHEN	3x unbehandelte Defekte	3x nicht modifiziertes Fettgewebe	3x Ad.BMP-6 aktiviertes Fettgewebe

Tabelle 3: Versuchsgruppen Histologie

2.2.4 Fixateur

Als Fixateur wird ein eigentlich externes System gewählt, das in diesem Versuch aber intern verwendet wird. Es besteht aus vier Pins (Kirschner Drähten) mit einem Durchmesser von 1,1mm und zwei Platten aus Polyethylen. Eine der beiden Platten, die für eine Ratte benötigt werden, wird an den kurzen Kanten abgeschliffen, sodass diese abgerundet sind, um das Risiko für Hautirritationen zu mindern. Diese Platte ist im Verlauf die obere. Die Platten sind 2,5cm lang, 0,65cm breit und 0,3cm hoch. Jede Platte hat vier Löcher im Längs- und Querschnitt. In die Löcher im Querschnitt werden Schrauben eingedreht, die im Verlauf die Pins in den senkrechten Löchern fixieren. In Abb. 6 ist eine 3D-Grafik der Fixateurplatte mit bereits eingedrehten Schrauben dargestellt.

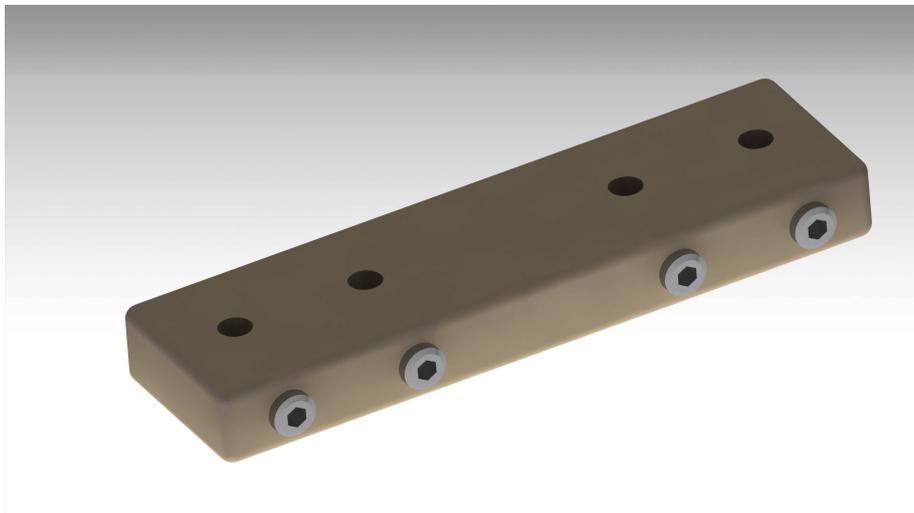


Abbildung 6: 3D-Bild einer Fixateurplatte mit Schrauben

2.2.5 Gewebeentnahme und Transduktion

Zu Beginn jeder OP-Reihe wird subkutanes Fettgewebe in der Hüftregion eines Spender-tieres entnommen.

Dazu wird dieses Tier zunächst mit Isofluran betäubt und dann mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Im Anschluss wird der Spender rasiert, um daraufhin das Entnahmegebiet steril abzuwaschen. Im weiteren Verlauf werden unter einer Sterilbank die Gewebeentnahme sowie die Zerkleinerung des Fettgewebes vorgenommen. Nun werden die Gewebestücke gleichmäßig auf die Wells einer 24-Well-Platte mit Transduktionsmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) verteilt und jeweils mit $40\mu\text{l}$ Vektorlösung behandelt. Hierfür wird der Vektor zunächst im Verhältnis 1:3 mit PBS-Puffer (pH 7,4) verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 30min im Brutschrank (bei 37°C , $5\%CO_2$) wird die Transduktion durch Zugabe von FCS-haltigem Standardmedium (Zusammensetzung siehe Anhang) gestoppt. Die hierin enthaltenen Proteine binden an den Vektor und inaktivieren ihn. Somit kann dieser nicht mehr in die Fettzellen aufgenommen werden. Die vorbereiteten Proben können dann, nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank, innerhalb der nächsten drei Tage in die Empfänger implantiert werden. Wobei sie zuvor noch gründlich gewaschen werden. In Abb. 7 ist die Menge Fettgewebe dargestellt, welche im Verlauf in ein Empfängertier implantiert wird.

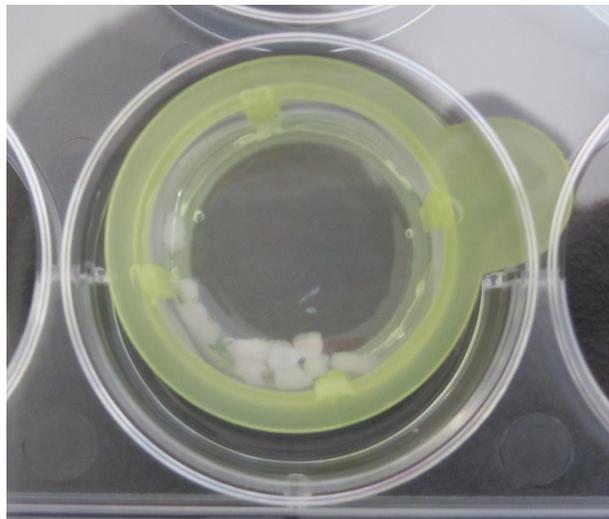


Abbildung 7: implantationsbereites Fettgewebe

2.2.6 Operation

Alle operativen Eingriffe verlaufen unter sterilen Bedingungen. Es werden sterile Einwegartikel verwendet, Mehrwegmaterialien werden im Autoklaven bei 134°C und einem Druck von 2bar sterilisiert.

Die Ratten werden initial mit 3Vol.% Isofluran und 2ml Sauerstoff pro Minute betäubt. Als Erhaltungsdosis der Gasnarkose wird ein Gemisch aus 2Vol.% Isofluran und 2ml Sauerstoff pro Minute verwendet. Nach der gründlichen Rasur des rechten Hinterlaufs wird das OP-Gebiet dreimal abwechselnd mit Iodoform und 70% Ethanol desinfiziert. Jedes Tier bekommt dann in den linken Hinterlauf subkutan (s.c.) 0,01mg/kg Körpergewicht (KG) Cefuroxim als Infektionsprophylaxe und 0,025mg/kg KG Buprenorphin zur Analgesie injiziert.

Der Hautschnitt reicht über das gesamte Femur. Nach der sorgfältigen Präparation des Oberschenkelknochens wird am proximalen Ende der Kondylen das erste Loch gebohrt und ein Kirschner Draht eingebracht. Er wird 5mm in den Knochen gedreht und anschließend auf ca. 20mm gekürzt. Als Schablone für die weiteren Bohrlöcher dient nun die ungeschliffene Platte des Fixateursystems, welche auf den ersten Pin gesetzt wird.

Nachdem alle Pins eingebracht sind, wird auf sie zunächst die ungeschliffene und danach die geschliffene Platte gesetzt. Beide werden ca. 10mm über dem Muskel fixiert, um im Verlauf das Femur zu stabilisieren und in der anatomisch korrekten Lage zu fixieren. Der Defekt wird mit einer Kugelfräße (Durchmesser 0,5mm) eingebracht und anschließend mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült. Im Anschluss wird das Femur je nach Gruppenzugehörigkeit behandelt. Hierzu werden die mit Ad.BMP-6 aktivierten Fettgewebstückchen dreimal mit 40ml PBS-Puffer gewaschen, um sicherzustellen, dass kein Vektor mehr am Gewebe haftet. Danach wird der Muskel mit einem resorbierbaren Faden (4-0 Vicryl) verschlossen. Im Anschluss daran werden die Platten bis auf ca. 1mm über den Muskel abgesenkt, so soll einem Kompartmentsyndrom vorgebeugt werden. Nach Fixation der unteren Platte wird die geschliffene wieder abgenommen und die Pins soweit gekürzt, dass sie wenn die obere Platte wieder aufgesetzt ist, nicht überstehen. Nachdem auch die obere Platte fixiert ist, wird die Wunde mit Hautklammern verschlossen. Eine fotografische Übersicht über den Ablauf der Operation zeigen Abb. 8 bis 11. Im Anschluss an die Operation bekommen die Ratten weitere 0,025mg/kg KG Buprenorphin s.c. injiziert. Diese Therapie wird innerhalb der ersten 48 Stunden alle 12 Stunden wiederholt.



1.) Betäubte Ratte mit sterilisiertem Operationsgebiet



2.) Steril abgedecktes OP-Gebiet

Abbildung 8: Ablauf der Operation Schritt 1 und 2

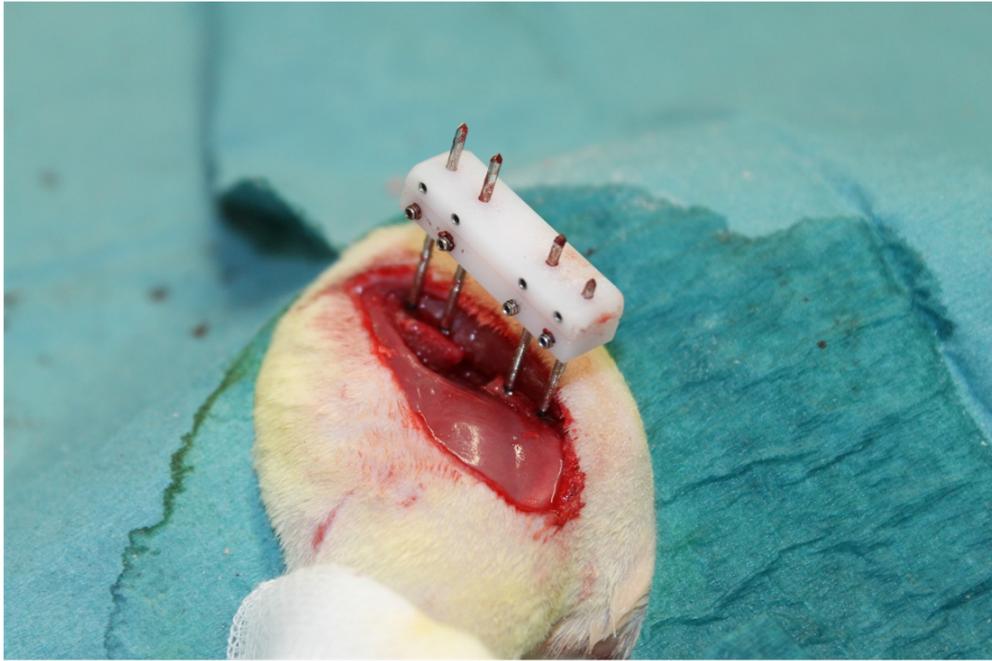


3.) Freipräpariertes rechtes Femur



4.) OP-Gebiet nach Anbringen des Fixateurs

Abbildung 9: Ablauf der Operation Schritt 3 und 4



5.) Kritischer Knochendefekt

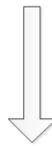


6.) Verschlussene Muskeltasche

Abbildung 10: Ablauf der Operation Schritt 5 und 6



7.) Endposition des Fixateurs



8.) Nach Verschluss der Wunde

Abbildung 11: Ablauf der Operation Schritt 7 und 8

2.2.7 Entnahme der Femora

Zur Entnahme der Femora werden die Ratten zunächst mit Isofluran betäubt und im Anschluss mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert.

Anschließend werden beide Femora in Hüfte und Knie exartikuliert und an den Epiphysen sowie den Metaphysen vom umgebenden Weichteilgewebe befreit. Am rechten Oberschenkelknochen bleibt zwischen den beiden inneren Pins das Muskelgewebe stehen und dient so als Schutz für die Defektzone.

Je nach Auswertung werden die Femora dann entweder bei -20°C eingefroren (MicroCT und Biomechanik) oder in Paraformaldehyd (Histologie) fixiert.

2.2.8 MicroCT

Das MicroCT wurde in dieser Arbeit als Verfahren für die Auswertung gewählt, weil es die quantitative Volumenbestimmung innerhalb der Defektzone erlaubt. Das in diesem Versuch verwendete Programm heißt VivaCT, man steuert hiermit einerseits das CT-Gerät und kann andererseits damit die Messungen auswerten.

Probenvorbereitung Um einen Scan mit Hilfe des MicroCT durchzuführen, müssen die entnommenen Oberschenkelknochen aufbereitet werden. Hierbei werden zunächst die Platten des Fixateurs von den Femora entfernt, da das gesamte Konstrukt für die Halterung zu dick ist. Außerdem ist es nötig die Pins auf etwa 3mm über dem Muskel zu kürzen. Dann können die Proben in Schaumstoff eingebettet in die Haltevorrichtung eingebracht werden. Während einer Messung werden die Proben in 0,9% NaCl gelagert.

Messung Die Erstellung der Scans erfolgt im μ CT80 von Scanco Medical, bei 70keV und $114\mu\text{A}$. Zunächst wird von jedem Knochen ein Röntgenbild erstellt, welches für die röntgenologische Auswertung gespeichert wird. Danach werden von jedem Knochen ca. 420 Schnitte angefertigt, wobei jeder eine Dicke von $36\mu\text{m}$ aufweist. Daraus werden dann mit Hilfe der oben genannten Software die Bilder rekonstruiert.

Auswertung Zunächst wird im Rahmen der Auswertung die Region of Interest (ROI) markiert und anschließend dort das Knochenvolumen berechnet, woraus im Verlauf das 3D-Bild rekonstruiert wird. Dieses kann dann im 3D-Viewer von allen Seiten betrachtet werden. Im Anschluss wird das Bild in der Sagittalebene geschnitten, wodurch die Struktur im Innern des Knochens sichtbar wird.

Als nächstes soll das Knochenvolumen innerhalb der Defektzone der einzelnen Femora miteinander verglichen werden. Dazu wird zunächst die Mittellinie im Defekt bestimmt und dann das Knochenvolumen 1,5mm ober- und unterhalb dieser gemessen. So erhält man das Knochenvolumen der mittleren 3mm eines Defekts. Dieser Wert macht eine vergleichende Betrachtung hinsichtlich des Volumens des neu gebildeten Knochens zwischen den einzelnen Versuchsgruppen möglich.

Für die statistische Auswertung des Knochenvolumens in den mittleren 3mm des Defekts wird mit Hilfe des Programms GraphPrism 5 ein Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant gilt.

2.2.9 Biomechanik

Im Rahmen der biomechanischen Testung wird die Kraft gemessen, welche aufgebracht werden muss, um an den Knochen einen Torsionsbruch herbeizuführen. Mit dieser Methode werden nur die Knochen ausgewertet, welche zuvor im MicroCT eine knöcherne Überbrückung des Defekts aufgewiesen haben. Es handelt sich hierbei um fünf Femora, welche mit genmanipuliertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Verglichen werden diese Proben mit sechs gesunden Femora der Gegenseite.

Probenvorbereitung Zur Vorbereitung der Messung werden die Proben in Kunststoff (Poly-Methyl-Methacrylat, PMMA) eingebettet. Dazu wird der Knochen zunächst in eine Form eingespannt, sodass die Femurkondylen und der Femurkopf optimal in der Mitte der Öffnungen für den Kunststoff stehen. Im Anschluss wird das Pulver Technovit 3440 mit Technovit Universal Liquid im Verhältnis 2:1 gemischt und in die vorgesehenen Öffnungen gefüllt. Nach 15min Trockenzeit kann die Form umgedreht und der Vorgang für das andere Knochenende wiederholt werden.

Messung Die Messung des Drehmoments, welches aufgebracht werden muss, um dem Knochen einen Torsionsbruch zuzufügen, wird mit der *Fast TrackTM* 8874 (Instron 1) durchgeführt. Die Maschine besitzt hierzu eine große (grobe) und eine kleine (feine) Messdose. Der Knochen wird mit Hilfe seiner eingebetteten Enden fest in die Maschine eingespannt. Unter einer axialen Vorlast von 4N wird anschließend das proximale Knochenende gegen das distale mit konstant 5rad/min verdreht. Abb. 12 veranschaulicht den Versuchsaufbau.

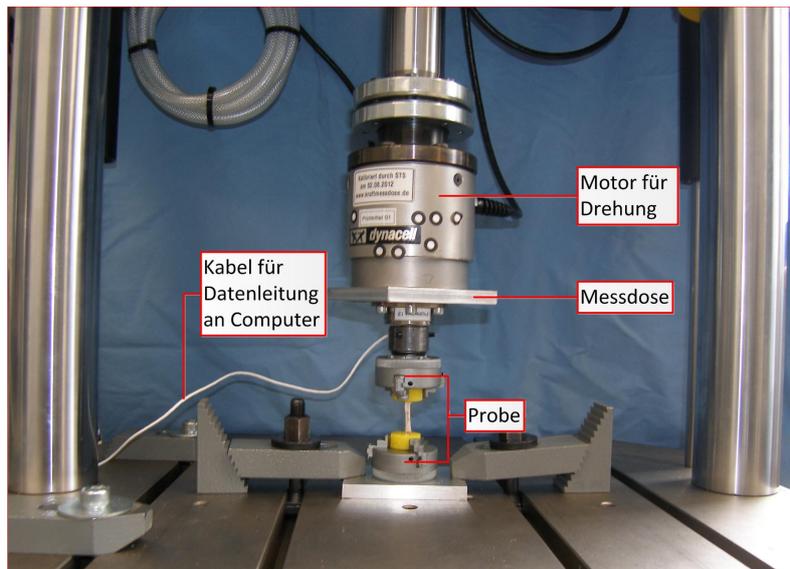


Abbildung 12: Versuchsaufbau biomechanische Messung

Auswertung Zur Auswertung wird das zur *Fast TrackTM 8874* (Instron 1) gehörende Computerprogramm (Instron 1) verwendet. Hieran werden die von den Dosen gemessenen Daten übermittelt und aufgezeichnet. So kann der Messverlauf für jeden Knochen einzeln gespeichert werden. Die Daten aller Messpunkte werden in einer Excel-Tabelle gespeichert. Hieraus wird der höchste Wert ermittelt und anschließend für die statistische Auswertung verwendet.

Für diese wird mit Hilfe der Software GraphPrism 5 ein Wilcoxon-Paardifferenztest durchgeführt, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wird.

2.2.10 Histologie

BMP-6 induziert bei der Knochenbildung eine enchondrale Ossifikation, daher wird in dieser Arbeit zur Darstellung der Defektheilung die Safranin-O-Lichtgrün-Färbung verwendet, bei welcher sich Safranin-O an saure Glykosaminoglykane bindet, die in der Knorpelmatrix vorkommen. Lichtgrün wird dabei als Gegenfärbung verwendet, da es die Proteoglykane ausspart [61]. So färbt sich Knorpel rot und Knochen grün an, wodurch Knorpel im Defekt gut zu erkennen ist.

Vorbereitung der Proben Nachdem die Femora von den euthanasierten Tieren entnommen sind, werden sie zunächst für drei Tage bei 8°C in Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wird die Probe mit klarem Wasser abgewaschen und in ein 50ml Falcontube mit 40ml EDTA-4 Natrium 20% Zitronensäure (pH 7,1) überführt. Hier werden die Femora für 34 Tage bei 8°C entkalkt. Nun kann der Knochen der Länge nach in zwei Hälften geschnitten werden, welche im Anschluss in Probenkassetten verwahrt werden. Um die Femora am Automaten in Paraffin einzubetten, werden die Probenkassetten für einen Tag unter fließendem Wasser gewässert. So wird sichergestellt, dass die Entkalkungsflüssigkeit restlos entfernt ist.

Die Behandlung im Gewebereinbettungsautomaten läuft dann in vier Schritten ab, wobei zunächst die Fixation erfolgt, dann werden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) dehydriert. Im darauffolgenden Schritt führt der Automat das Clearing mittels Rotihistol durch, um abschließend die Paraffininfiltration vorzunehmen. Zur Einbettung in Paraffin erhitzt das Gerät das Paraplast auf 60°C. Die anschließende Aushärtung der eingeschlossenen Proben erfolgt auf einer Platte, welche auf -10°C gekühlt wird.

Zum Schneiden werden die Proben zunächst über Nacht auf 4°C heruntergekühlt. Mit Hilfe des Rotations-Mikrotoms Leica RM 2255 können dann am darauffolgenden Tag 8µm dicke Paraffinschnitte angefertigt werden. Nach Auffangen der Schnitte in einem warmen Wasserbad (40°C Aqua dest.) entfalten sich die Proben, sodass sie ohne Luftblasen auf einen Adhäsions-Objektträger aufgezogen werden. Nun werden die Schnitte im Trockenschrank bei 60°C für 24 Stunden getrocknet.

Färbung mit Safranin-O-Lichtgrün Zur besseren Haftung der Schnitte werden die Objektträger vor der Färbung drei Stunden im Brutschrank (37°C) inkubiert. Um die Schnitte dann zu färben, müssen sie zunächst entparaffiniert (Entparaffinierungsprotokoll siehe Anhang) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden. Im Anschluss daran kann die eigentliche Färbung mit Safranin-O/Lichtgrün durchgeführt werden. Hierfür wird zu-

nächst eine Stammlösung aus 3g Safranin T und 200ml Aqua dest. hergestellt, welche für die Färbung von Rattenfemora im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt wird. Dadurch entsteht eine 0,015%ige Lösung, mit welcher die Schnitte der Rattenfemora gefärbt werden (Färbeprotokoll siehe Anhang). So lassen sich durch Safranin-O Proteoglykane, und damit Knorpel, rot-orange färben. Das Lichtgrün lässt Knochen grün erscheinen. Zellkerne werden bei dieser Färbung dunkelrot dargestellt. So wird klar unterschieden, ob im hier untersuchten Defektsplatt ausschließlich Knochen vorhanden ist oder auch Knorpel.

Auswertung Die Histologie wird in der hier vorgestellten Studie rein deskriptiv ausgewertet. Sie soll die im MicroCT dargestellten Ergebnisse sichern und bestätigen.

Die Auswertung der Präparate erfolgt mit dem Lichtmikroskop Axioskop 40 der Firma Zeiss bei einer 25fachen Vergrößerung. Dabei werden die Präparate ausschnittsweise fotografiert und im Anschluss manuell mit Hilfe von Microsoft Power Point zu einem Präparat zusammengesetzt und beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Röntgenbilder

Vor Aufnahme der MicroCT-Bilder wurde von jeder Probe ein Röntgenbild erstellt. Hierbei zeigt sich, dass in der Versuchsgruppe, welche zwölf Wochen beobachtet wurde und in der die Defekte mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, in fünf von sieben Fällen eine knöcherne Durchbauung des Defekts vorliegt (siehe Abb. 17). In zwei Fällen ist ein Knochenfragment im Spalt zu sehen (siehe Abb. 17 E.1 und E.7). Bei allen anderen Gruppen, sowohl in der Versuchsgruppe, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen behandelt wurde, als auch in allen Kontrollgruppen ist keine knöcherne Überbrückung im Röntgenbild zu erkennen (siehe Abb. 13, 14, 15, 16)

3.2 MicroCT - Bilder

Das MicroCT wird in dieser Arbeit verwendet, um eine detaillierte Darstellung der Knochendefekte zu erhalten. Es ist so zum einen möglich den äußeren Aufbau des Knochens im Bereich des Defekts darzustellen. Zum anderen kann man mit Hilfe verschiedener Schnittebenen die Struktur im Inneren der Defektenden beurteilen, was Rückschlüsse auf die Stabilität erlaubt. Des weiteren kann hiermit das Knochenvolumen 1,5mm ober- und unterhalb der durch den Defekt verlaufenden Mittellinie bestimmt werden.

3.2.1 Kontrollen

Unbehandelte Defekte Auf den Bildern der unbehandelten Defekte (siehe Abb. 18) sieht man, dass es nach zwölf Wochen in keinem der acht Fälle zu einer Überbrückung des Defekts gekommen ist. Die Defektenden sind abgerundet und im Sagitalschnitt (siehe Abb. 19) ist zu sehen, dass die Röhren durch Kortikalis verschlossen wurden. In allen Fällen zeigen sich einzelne kleine Knochenfragmente innerhalb des Defekts. Auf Bild A scheint der Defekt deutlich schmaler als auf den anderen MicroCT-Bildern.

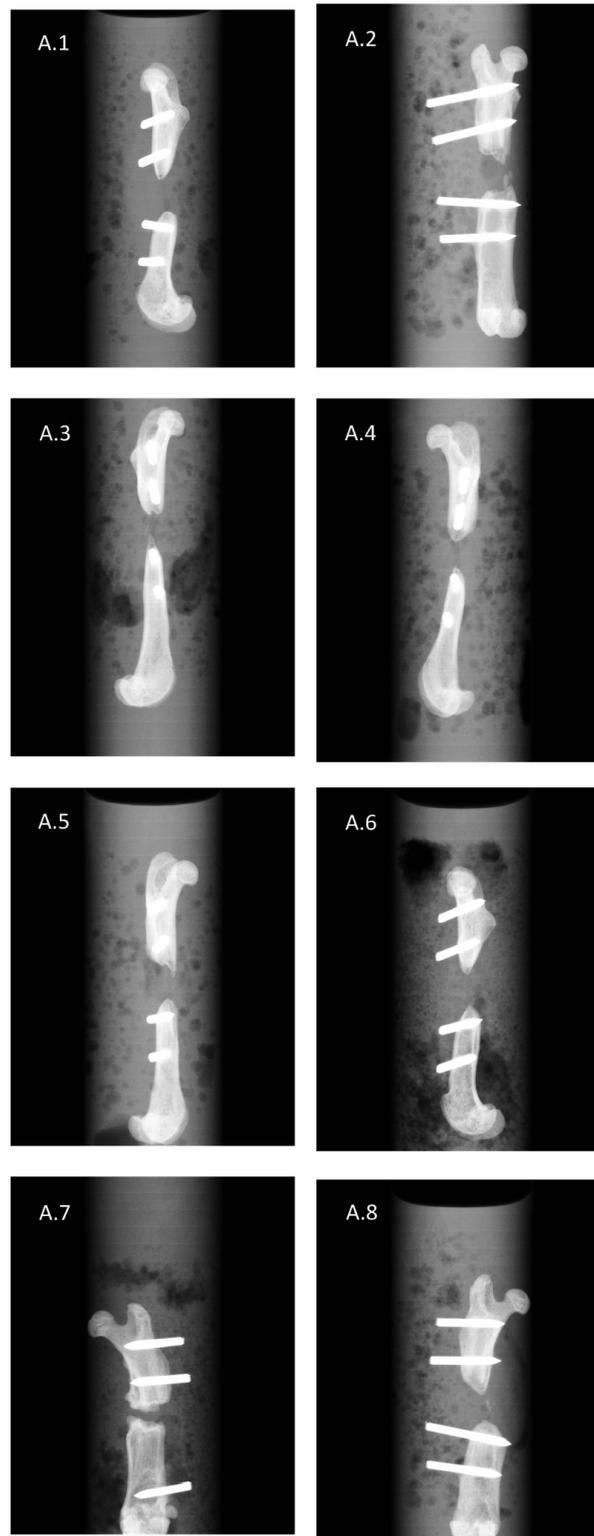


Abbildung 13: Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der unbehandelten Defekte. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.

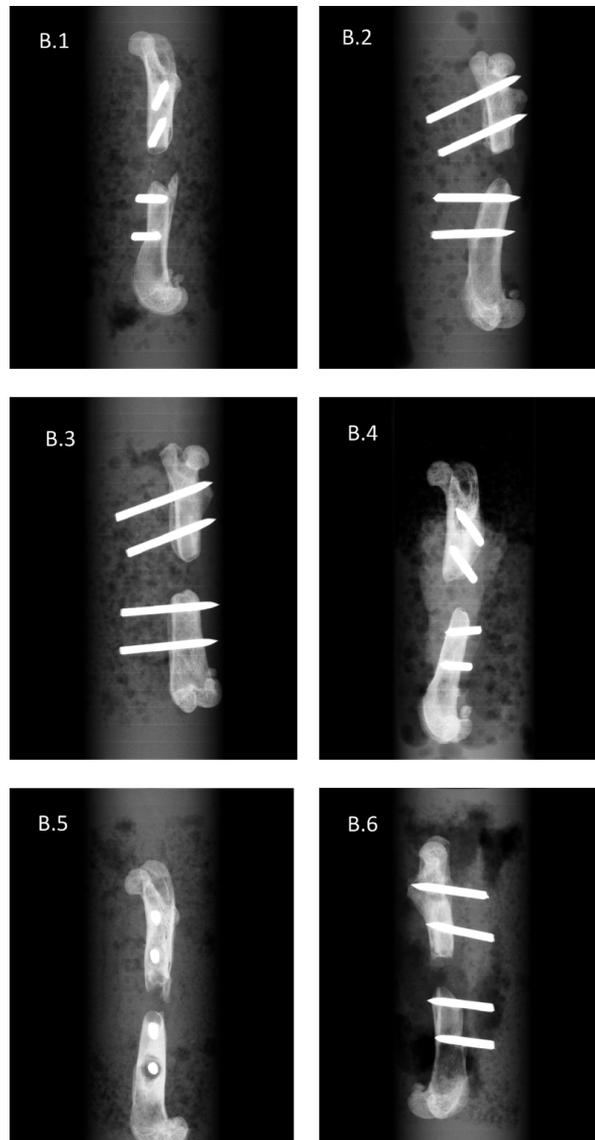


Abbildung 14: Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.

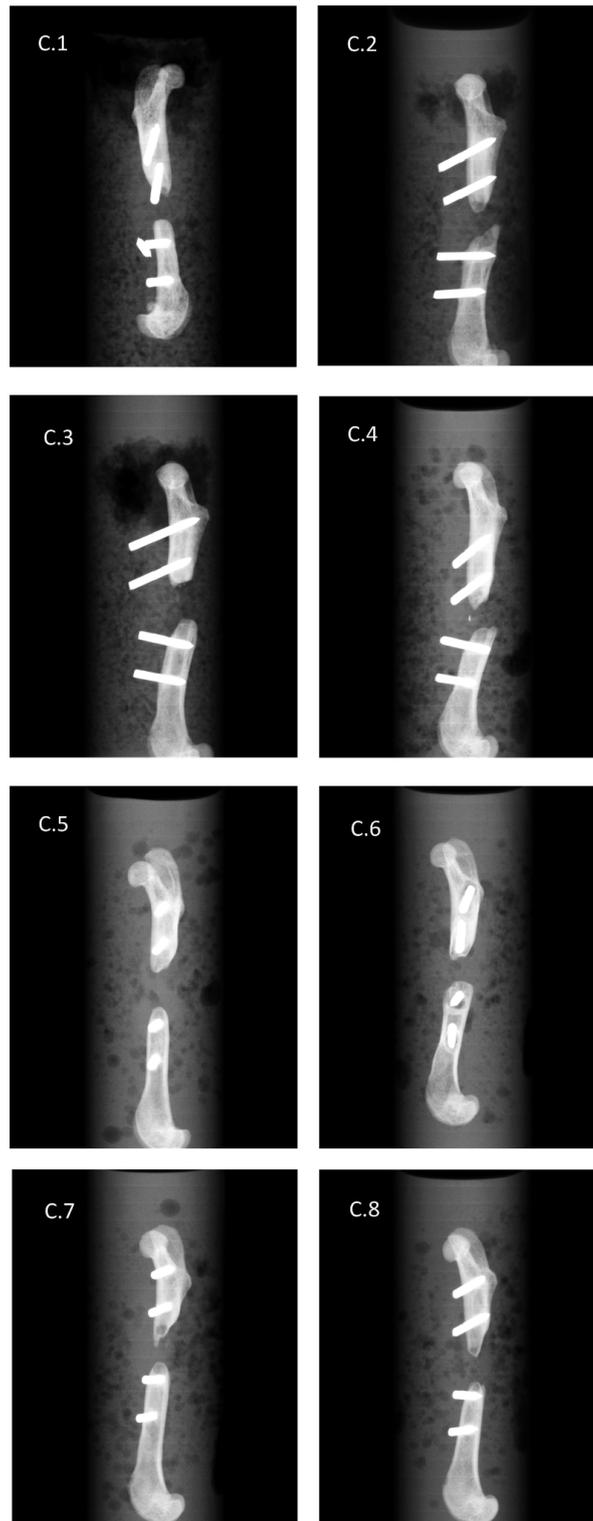


Abbildung 15: Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.

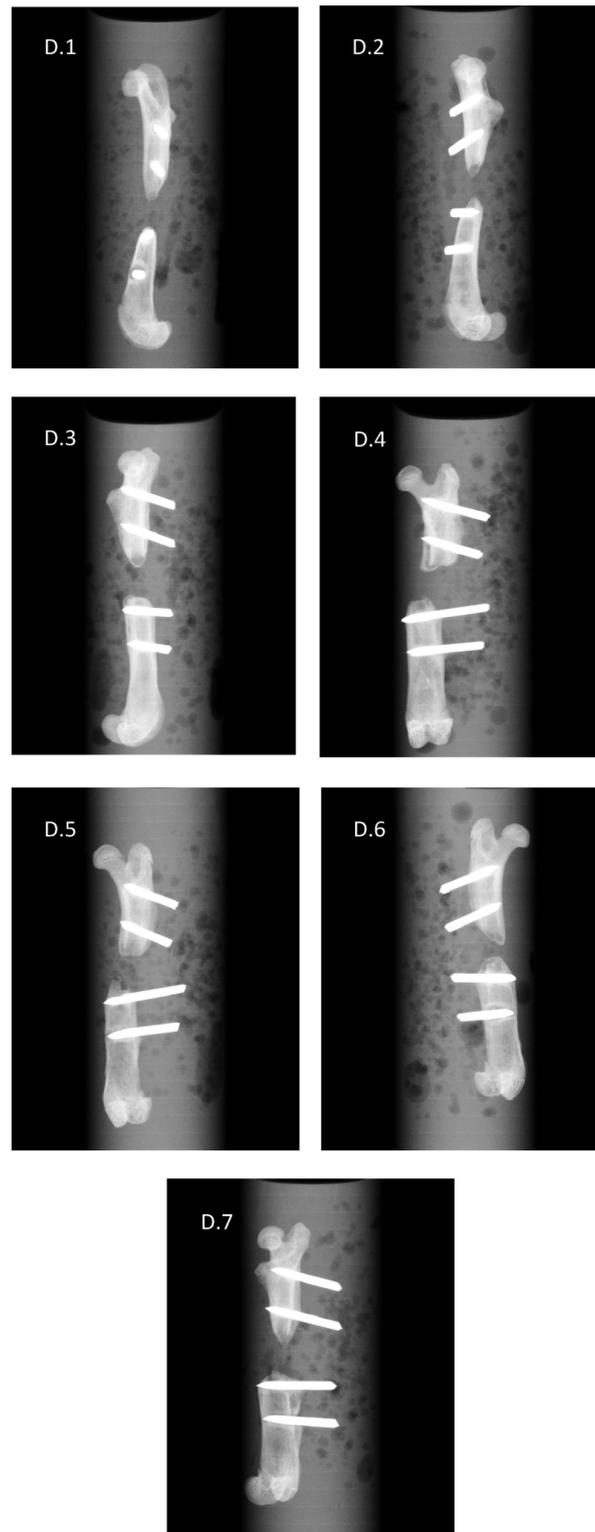


Abbildung 16: Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit AdBMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.

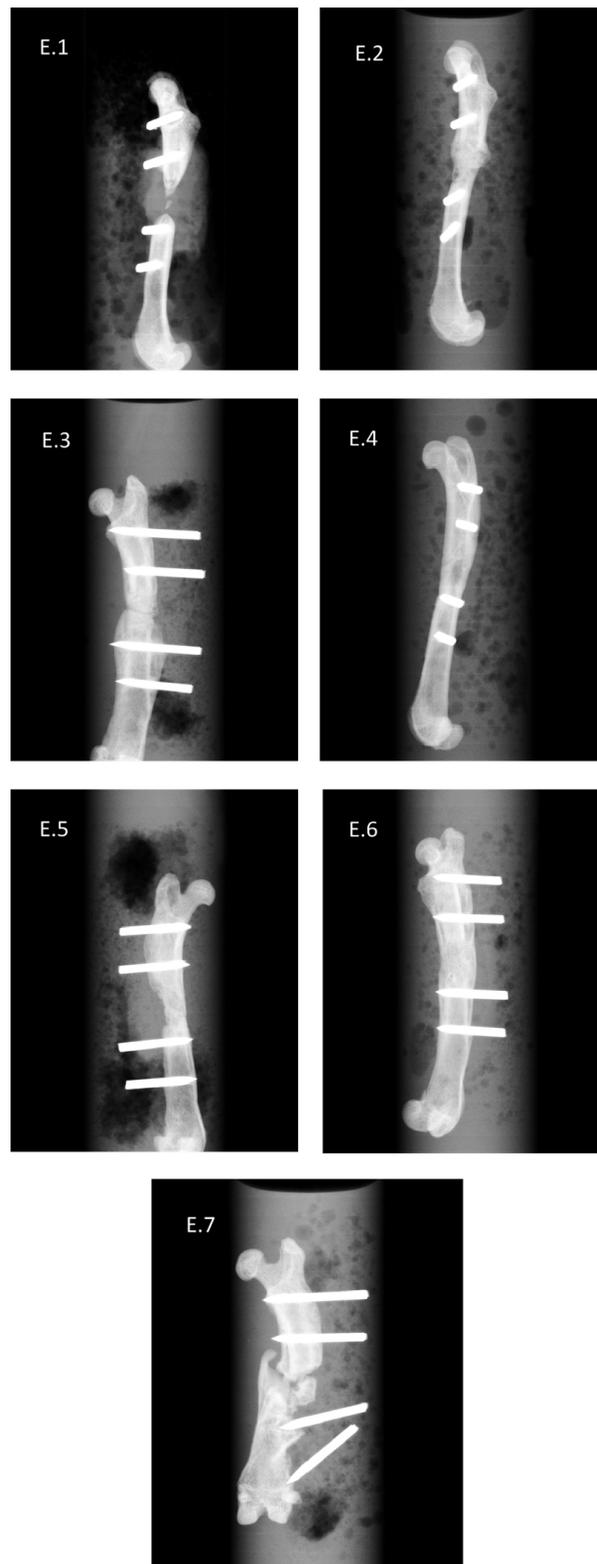


Abbildung 17: Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit AdBMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Fünf der sieben femoralen Defekte wurden knöchern durchbaut. Bei zwei Defekten (E.1 und E.7) findet sich im Spalt ein Knochenfragment.

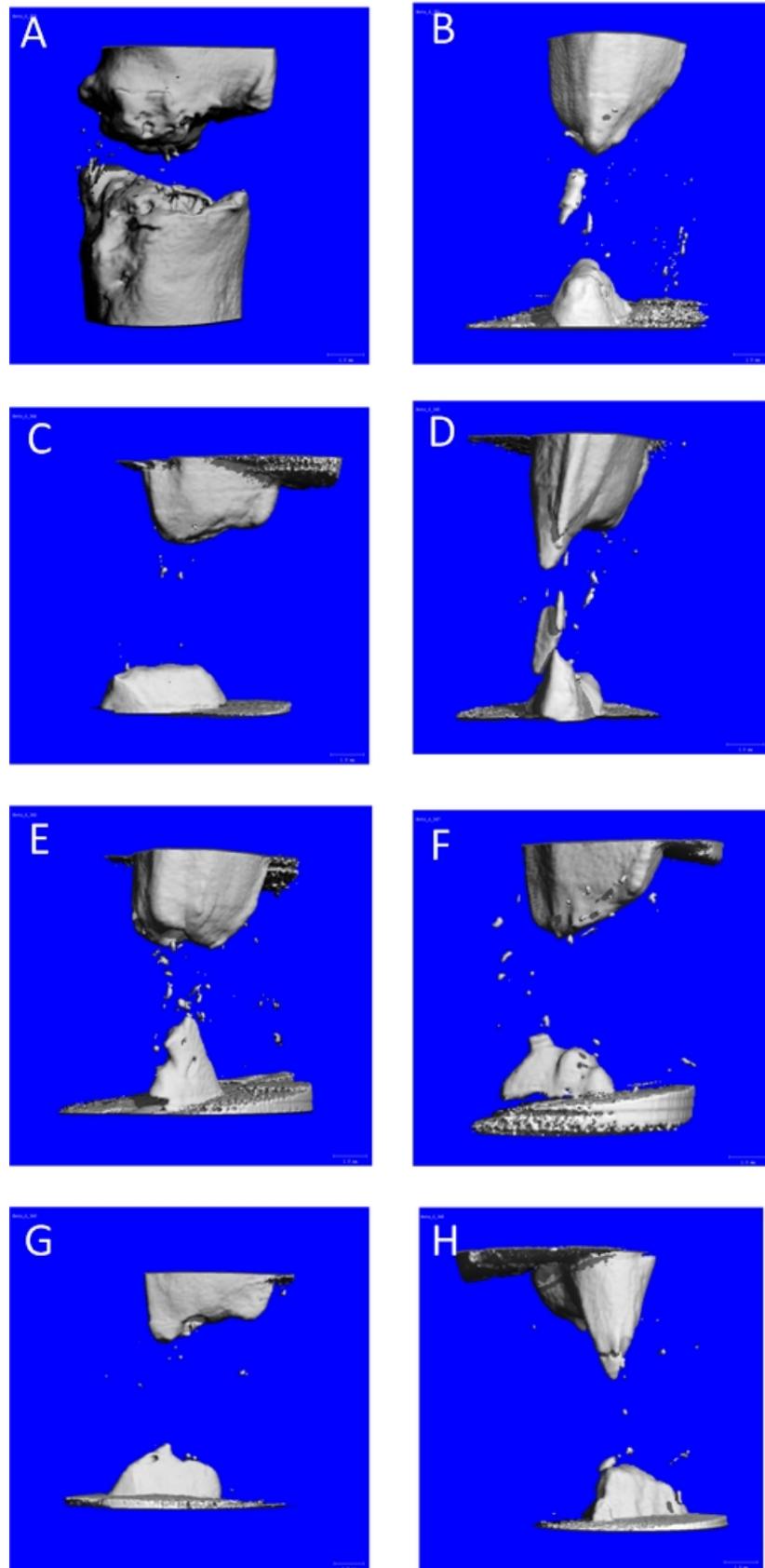


Abbildung 18: MicroCT-Bilder der unbehandelten Defekte zwölf Wochen nach der Operation. In keinem der Fälle kam es zur Defektüberbrückung.

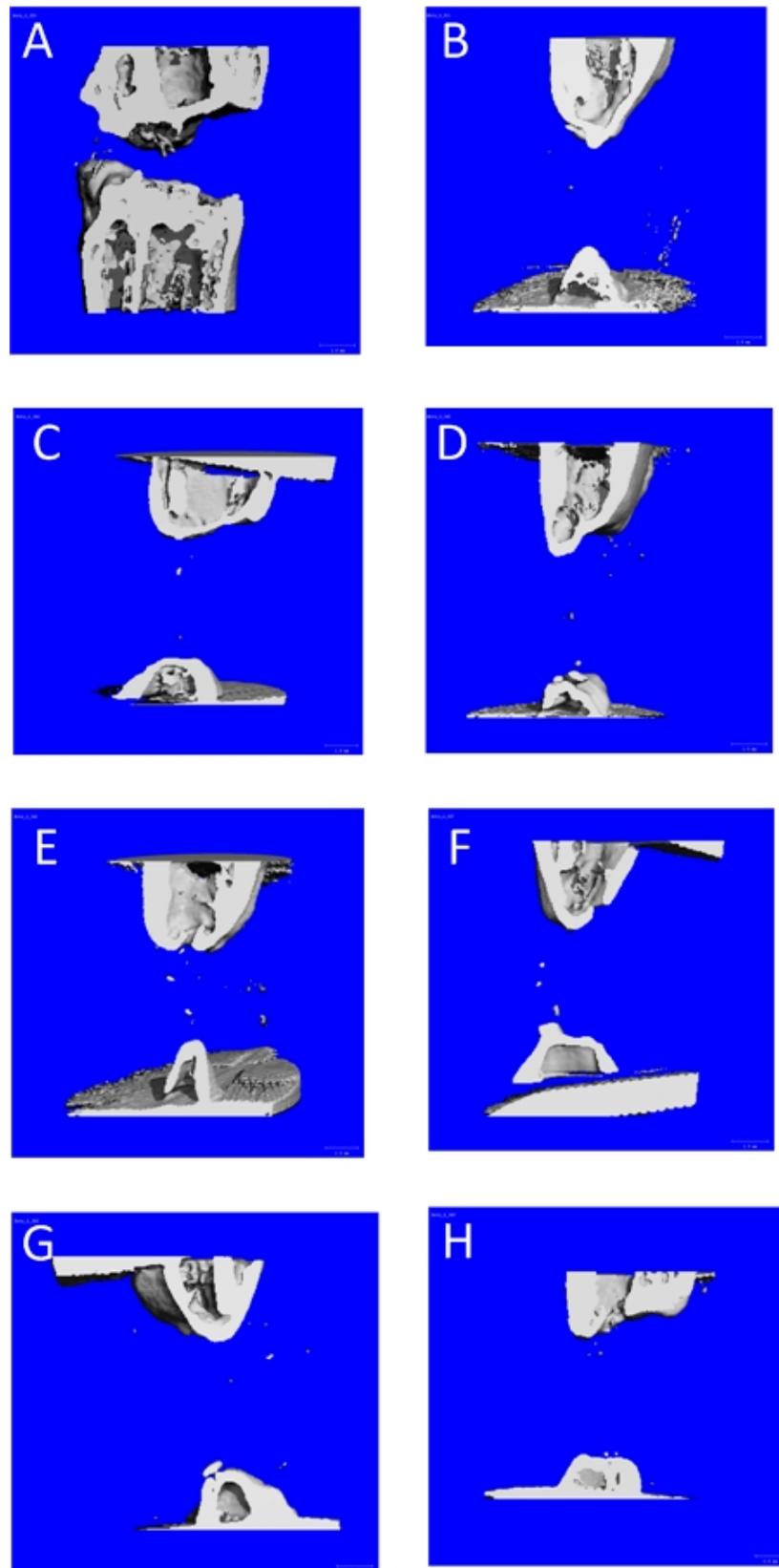


Abbildung 19: Sagittalschnitte der MicroCT-Bilder der unbehandelten Defekte zwölf Wochen nach der Operation. Zur knöchernen Durchbauung des Defekts kam es in keinem der Fälle.

Nicht modifiziertes Fettgewebe

Sechs Wochen In dieser Gruppe fielen zwei Tiere am ersten postoperativen Tag aus, sodass nur noch sechs Femora in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Der Ausfall dieser beiden Ratten ist am ehesten auf eine Unterkühlung während der OP-Zeit zurückzuführen. Bei der makroskopischen Obduktion konnte keine andere organische Ursache gefunden werden. Auch schien der Blutverlust peri- und postoperativ nicht höher als bei anderen Tieren.

Ähnlich wie die Scans der unbehandelten Defekte sehen auch die der mit nicht modifiziertem Fettgewebe versorgten Knochen nach einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen aus (vgl. Abb. 20). In keinem der sechs Fälle ist eine Überbrückung des Defekts mit Knochen zu erkennen. Außerdem sind die Defektenden abgerundet und scheinen verschlossen. In der Defektmitte zeigen sich einzelne Knochensplitter mit einer Größe von maximal 1mm.

Im Längsschnitt (Abb. 21) zeigt sich, dass diese Knochensplitter nicht hohl sind und auch keine Spongiosa im Inneren enthalten, sie bestehen aus massivem Knochen. Des weiteren sieht man in diesen Bildern, dass die abgerundeten Defektenden mit Kortikalis verschlossen sind. Ansonsten weist der Röhrenknochen die für ihn typische Struktur auf.

Zwölf Wochen Die Femora der Gruppe, welche natives, nicht modifiziertes Fettgewebe implantiert bekam und zwölf Wochen beobachtet wurde, präsentieren sich in den dreidimensionalen Rekonstruktionen (Abb. 22) wie die gleich behandelte, aber nur sechs Wochen beobachtete, Gruppe. Hier liegt ebenfalls in keinem der acht Fälle eine knöcherne Durchbauung vor. Auch hier erscheinen die Defektenden abgerundet und verschlossen. Des weiteren sieht man, wie bereits im Abschnitt zuvor beschreiben, Knochenfragmente im Defektspalt.

Die Sagittalschnitte (Abb. 23) weisen ebenso keine entscheidenden Unterschiede zu denen der Gruppe mit gleicher Behandlung und kürzerem Beobachtungszeitraum auf. Man sieht, dass die Defektenden abgerundet und von einer Kortikalis verschlossen sind.

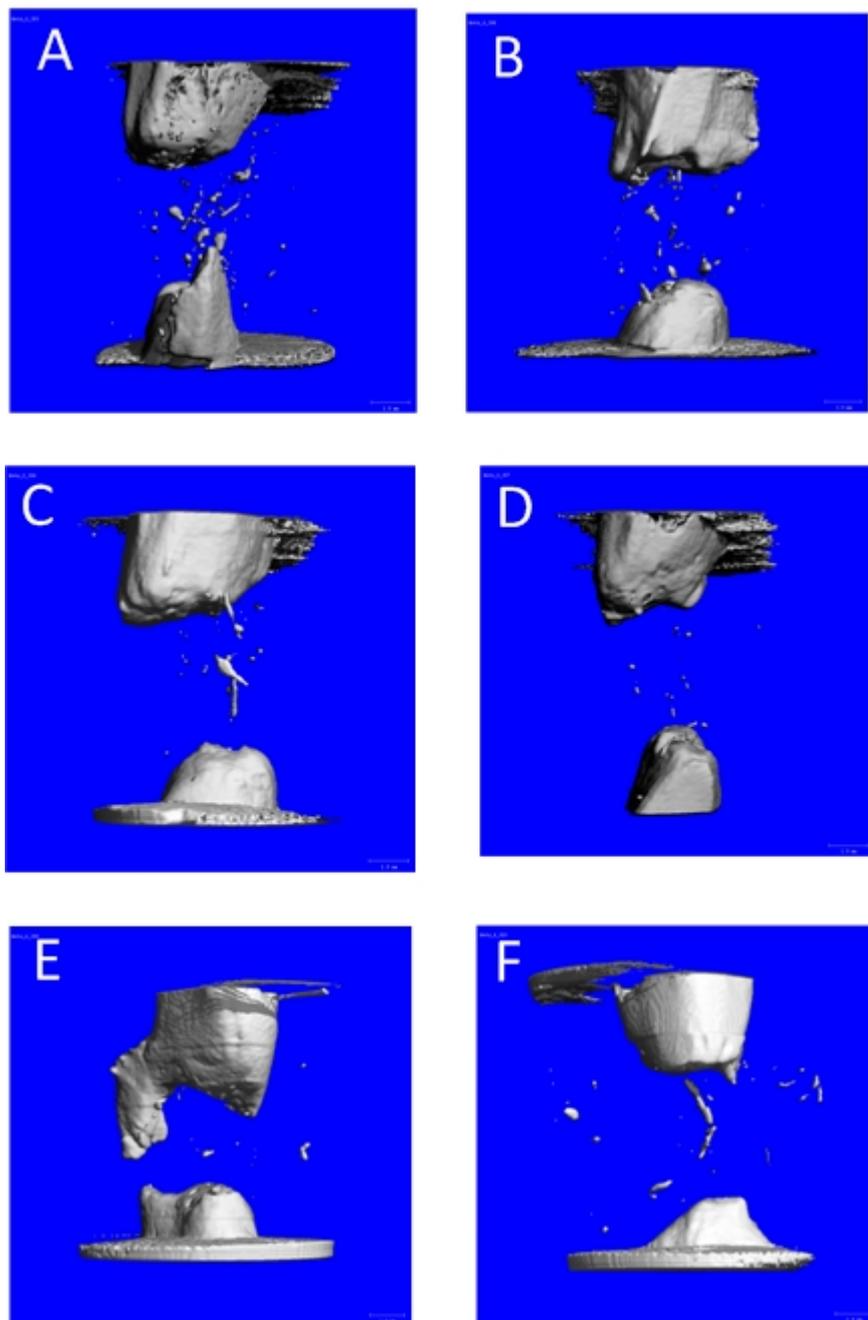


Abbildung 20: MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Keine der CT-Rekonstruktionen zeigt eine Überbrückung des Defekts mit Knochen.

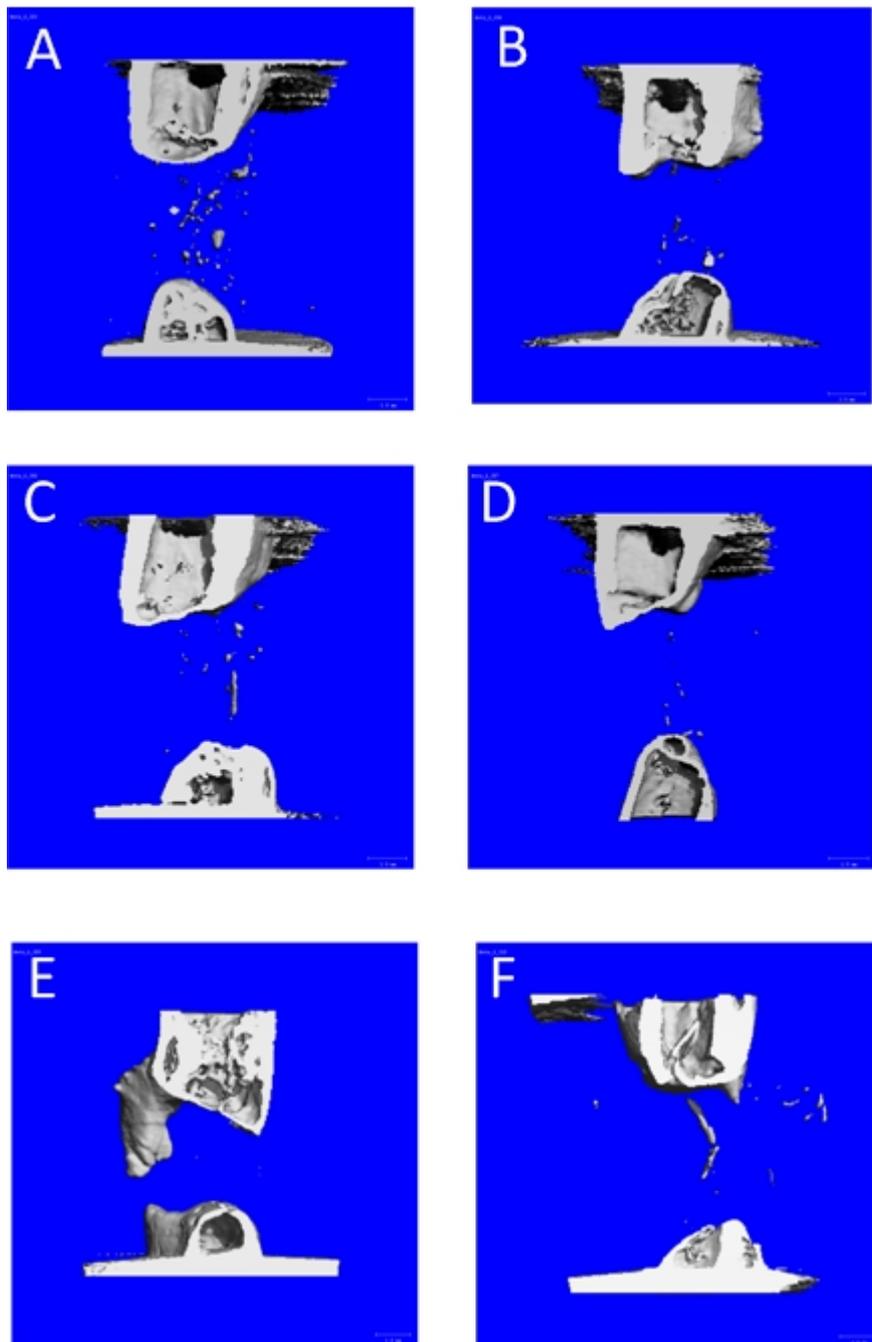


Abbildung 21: Sagittalschnitte der MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Die Defektüberbrückung blieb in allen Fällen aus.

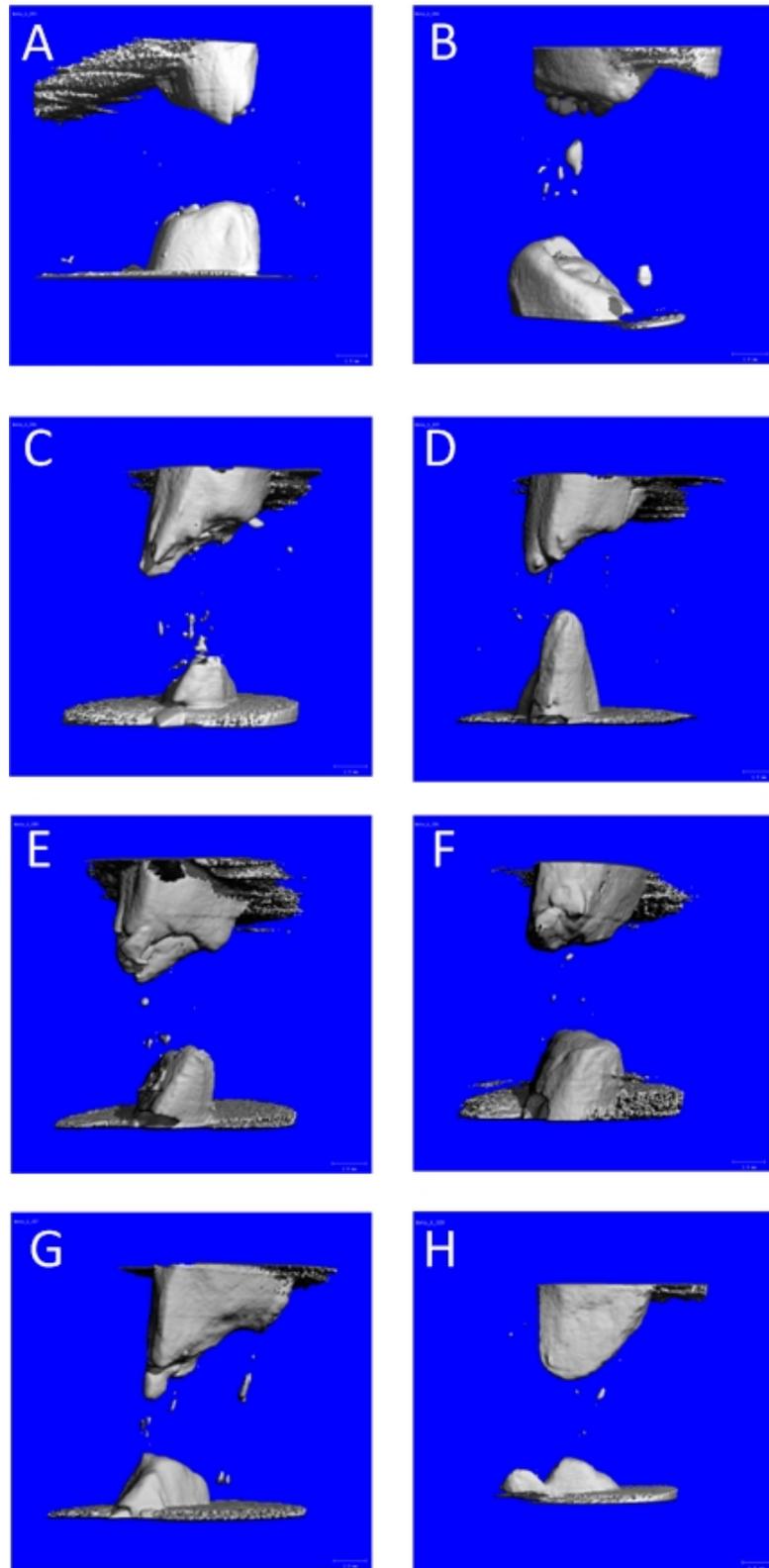


Abbildung 22: MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen. In keinem der Fälle kam es zu einer Überbrückung des Defekts.

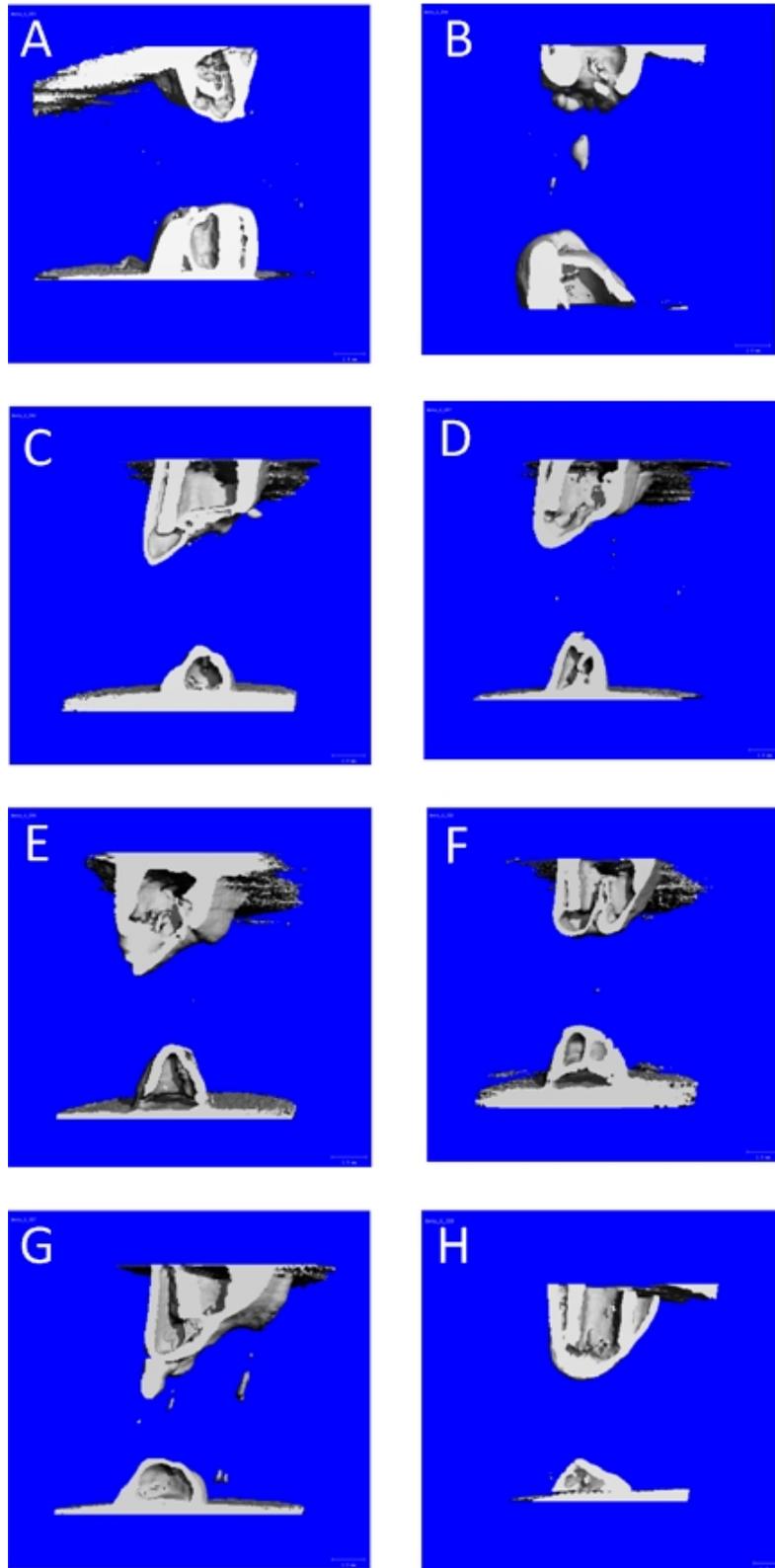


Abbildung 23: Längsschnitte der MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen. Kein Femur wurde knöchern überbrückt.

3.2.2 Ad.BMP-6-aktiviertes Fettgewebe

Sechs Wochen Auf den MicroCT-Bildern der Knochen, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, zeigt sich nach sechs Wochen in keinem der sieben Fälle eine knöcherne Überbrückung (siehe Abb. 24). Die Bilder gleichen im Allgemeinen denen der Kontrollen, wobei sich die Defektenden abgerundet darstellen und man im Defektpalt kleine knöcherne Fragmente sieht, deren Durchmesser im Durchschnitt weniger als 0,5mm beträgt.

Im Längsschnitt (Abb. 25) zeigt sich wiederum, dass die abgerundeten Defektenden von Knochen verschlossen sind. In den noch vorhandenen Röhren kommt der physiologische Aufbau zur Darstellung.

Zwölf Wochen Nach zwölf Wochen präsentieren sich die entnommenen Femora deutlich anders. Man kann bei fünf von sieben Defekten eine knöcherne Überbrückung feststellen (siehe B-F Abb. 26). Rein äußerlich fällt bei einem dieser sieben Präparate (Bild B) ein deutlich sichtbarer Kallus, etwa auf Höhe der ehemaligen Defektmitte, auf. Bei den restlichen durchbauten Proben erscheint der Knochen von außen von einer kompakten Kortikalis umgeben. Bei zwei Präparaten (Bild A und G) zeigt der Defekt keine knöcherne Durchbauung. Bei G befindet sich im Defektpalt ein ca. 4,0x2,5mm großes ovales Knochenstück, bei A liegt in der Defektmitte ein ca. 1,0x0,6mm großes, ovales Knochenfragment vor.

Diese Fragmente zeigen im Sagittalschnitt (vergleiche Abb. 27), dass sich unter der Hülle aus Kortikalis ein Geflecht aus Knochenbälkchen befindet. Auch in den Präparaten, bei denen der Defekt knöchern überbrückt wurde, zeichnen sich neben einer noch sehr dicken Kortikalis Areale mit Spongiosa ab, unabhängig von der äußeren Morphologie des Präparats.

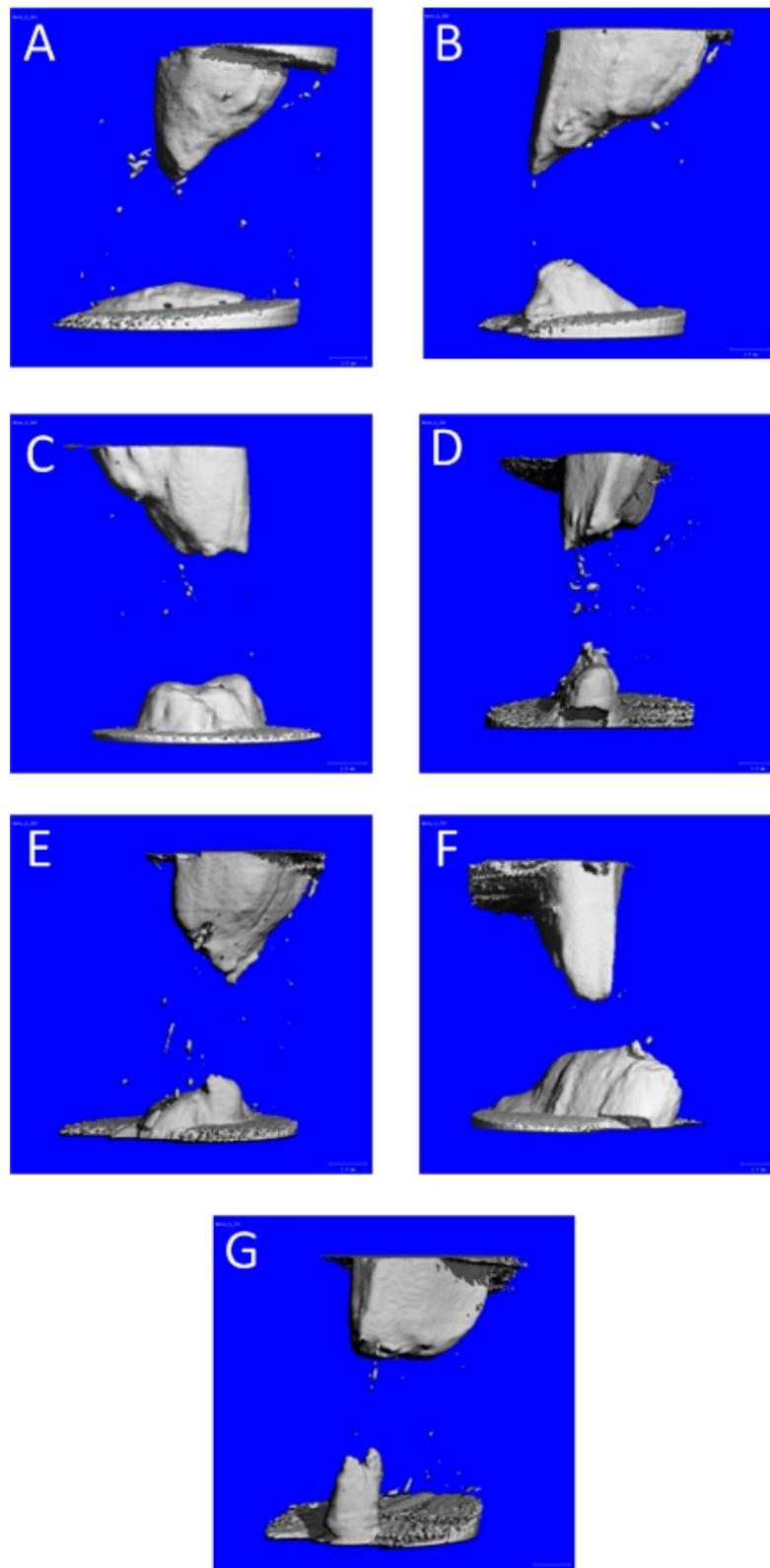


Abbildung 24: MicroCT-Bilder der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Auf keiner der Rekonstruktionen ist eine knöcherne Überbrückung erkennbar.

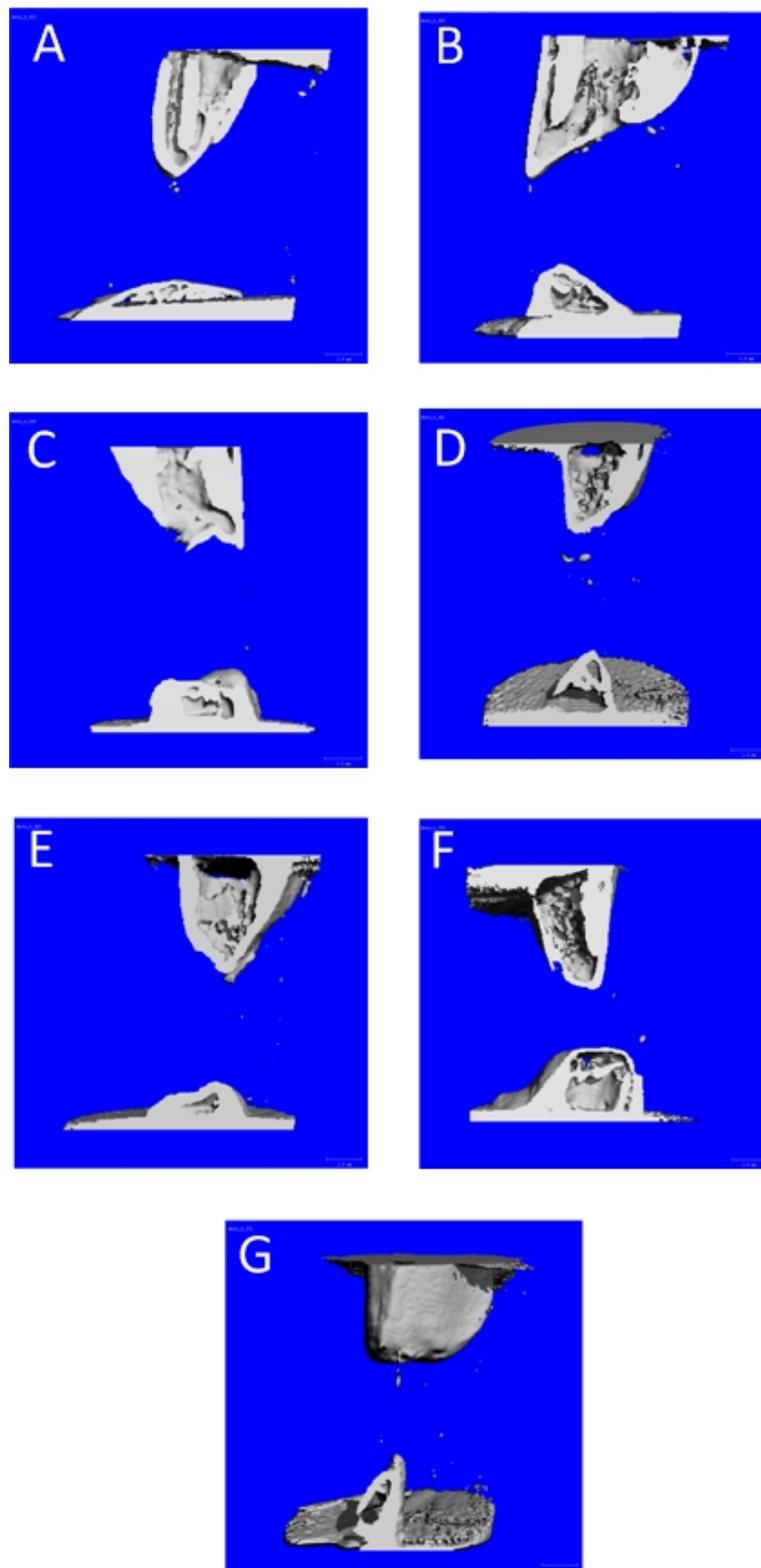


Abbildung 25: Sagittalschnitte der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. In keinem Fall zeigt sich eine knöcherne Durchbauung des Defekts.

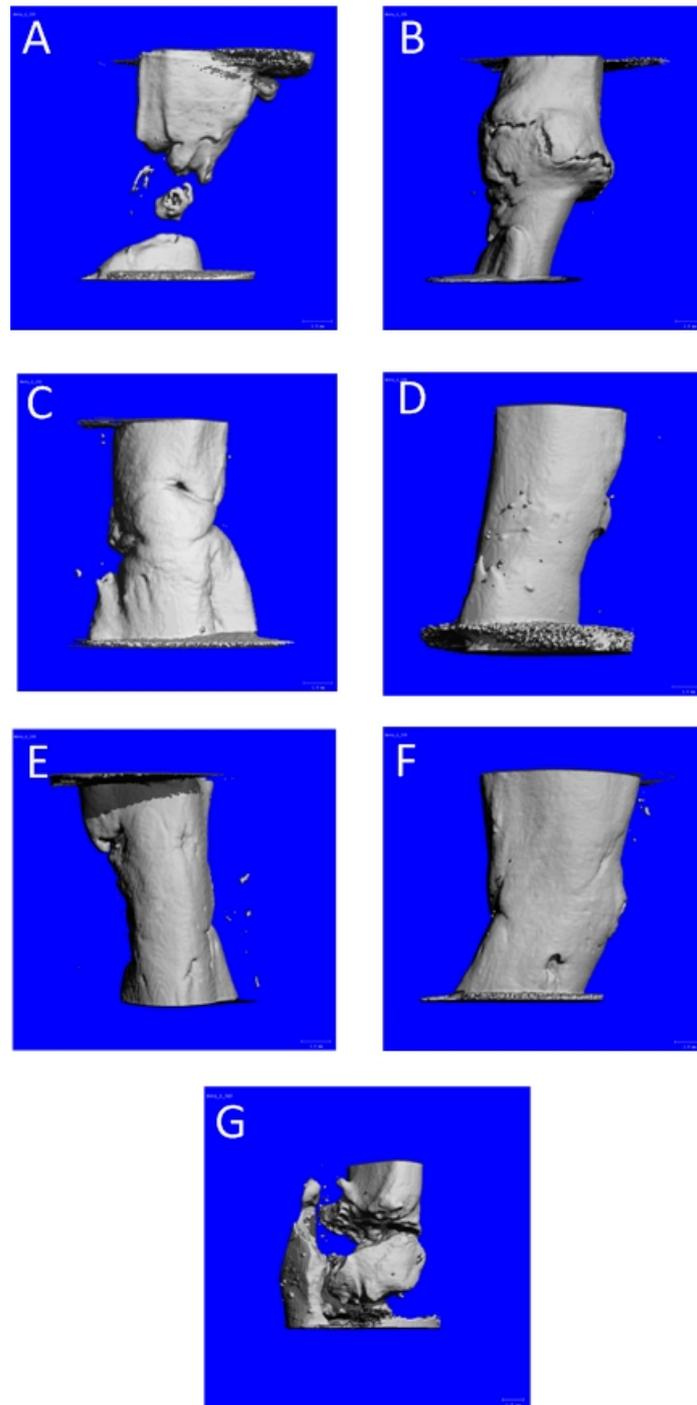


Abbildung 26: MicroCT-Bilder der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Fünf der sieben Femora (B-F) sind knöchern durchbaut, wobei an einem Femur (B) eine deutliche Kallusbildung zu sehen ist. In zwei Fällen (A und G) hat keine Überbrückung stattgefunden. Hier zeigt sich bei A ein ca. 1,0x0,6 mm großes, ovales Knochenfragment im Defektspalt, bei G ein etwa 4x2,5mm großes, ovales Knochenstück.

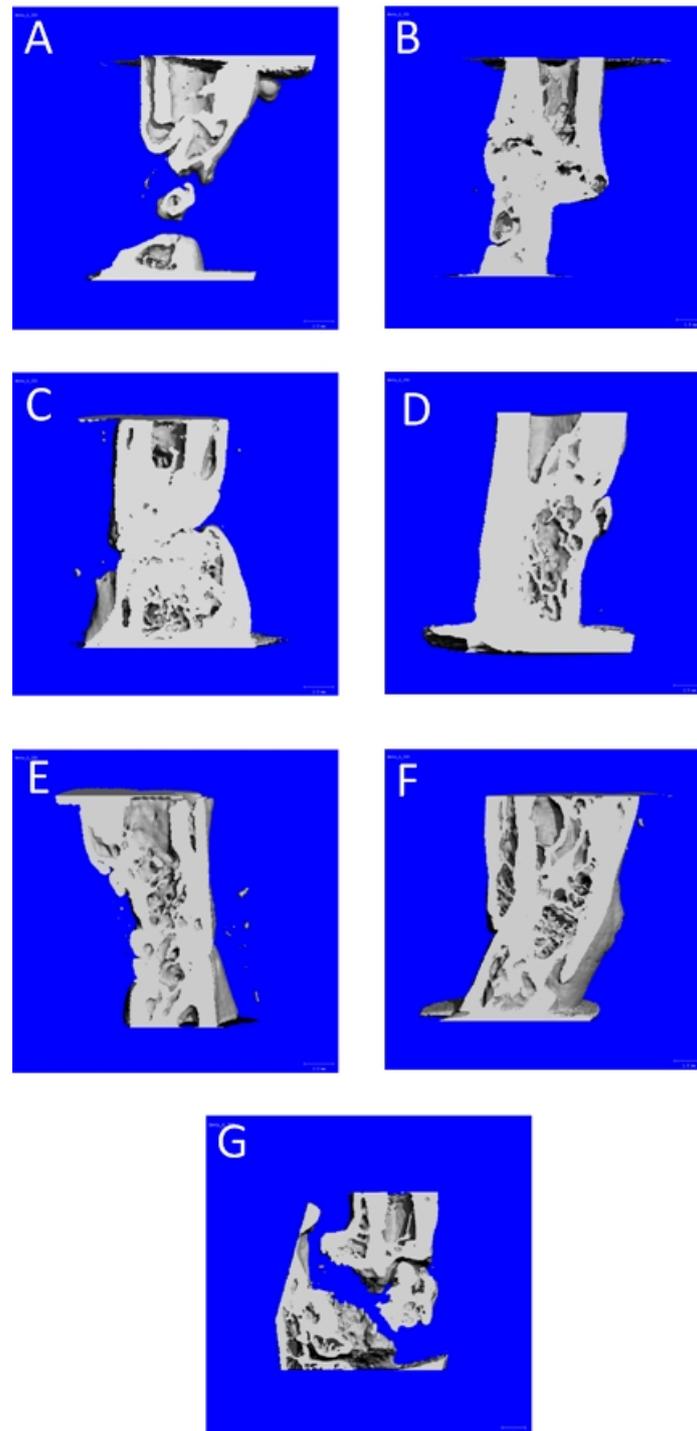


Abbildung 27: Sagittalschnitte der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Bei fünf von sieben Rekonstruktionen (B-F) zeigt sich eine knöchernen Überbrückung des Defekts. Drei Femora (D, E und F) weisen außen eine Kortikalis und im Markraum Spongiosa auf. Bei den anderen beiden Fällen (B und C) ist der Knochen im Inneren der ehemaligen Defektzone sehr kompakt.

3.3 MicroCT - Knochenvolumen im Defekt

Im Rahmen der Auswertung mittels MicroCT wurde das Knochenvolumen in einem Bereich von 3mm um die Defektmitte gemessen. Abbildung 28 zeigt den Vergleich dieser Knochenvolumina zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bzw. zwischen den beiden Beobachtungszeitpunkten innerhalb einer Versuchsgruppe. Es wird deutlich, dass sowohl bei den unbehandelten Defekten (n=8) als auch bei den Kontrollen, welche mit nativem Fettgewebe behandelt wurden (n=14), im Durchschnitt in der Defektmitte fast kein Knochen vorhanden ist. Allerdings ist vor allem in der Gruppe der unbehandelten Defekte die Streuung sehr groß und es gibt Präparate bei denen das Knochenvolumen in der Defektmitte bis zu 20mm^3 beträgt. Das mittlere Knochenvolumen in der Gruppe der mit manipuliertem Fettgewebe behandelten Tiere, welche nach zwölf Wochen euthanasiert wurden (Fett+AdBMP-6, 12 Wochen (n=7)), liegt mit ca. 27mm^3 dennoch deutlich höher. Des weiteren gibt es hier Femora, welche ein Volumen von bis zu 47mm^3 an Knochen aufweisen. In dieser Versuchsgruppe zeigt sich außerdem im Vergleich zu allen anderen Gruppen ein signifikant höheres Knochenvolumen ($p=0,0078$) 1,5mm ober- und unterhalb der Defektmitte.

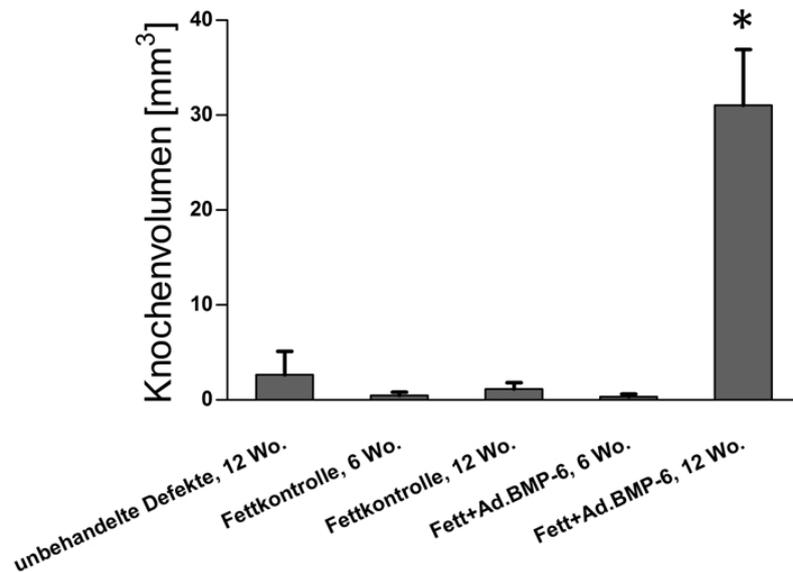


Abbildung 28: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den Kontrollgruppen und den mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten Versuchsgruppen jeweils nach sechs und zwölf Wochen, welches mit Hilfe des MicroCTs bestimmt wurde. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. Gemessen wurden $n=8$ unbehandelte Defekte, $n=14$ Fettkontrollen (sechs nach sechs Wochen und acht nach zwölf Wochen Beobachtungszeit) und $n=14$ Ad.BMP-6 aktivierte Fetttransplantate (sieben nach sechs Wochen und sieben nach zwölf Wochen Beobachtungszeit). *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen ($p=0,0078$).

In Abbildung 29 werden die Fettkontrollen ($n=6$) mit der Versuchsgruppe verglichen, welche mit genmanipuliertem Fettgewebe ($n=7$) behandelt wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Fällen sechs Wochen. Hierbei zeigt sich, dass die Kontrollgruppe ein signifikant höheres Knochenvolumen ($p=0.0313$) aufweist als die Versuchsgruppe.

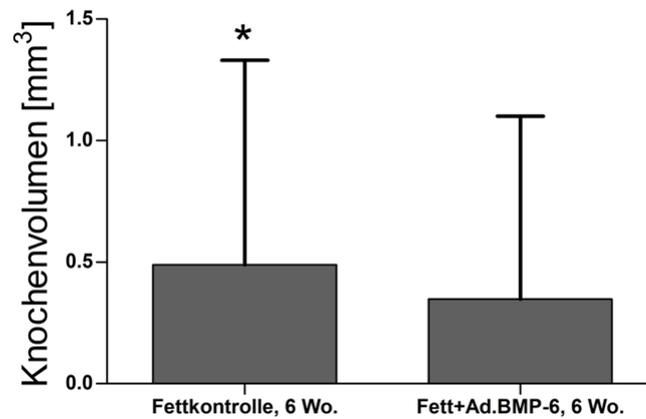


Abbildung 29: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen der Gruppe, welche mit nicht modifiziertem Fettgewebe (n=6) behandelt wurde und der, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe (n=7) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen sechs Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Fettkontrollen (p=0.0313).

Abbildung 30 zeigt, dass die Gruppe welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert und zwölf Wochen beobachtet wurde (n=7) ein signifikant höheres Knochenvolumen ($p=0,0078$) aufweist als die Präparate, welche mit unbehandeltem Fettgewebe versorgt und ebenfalls zwölf Wochen beobachtet wurden (n=8).

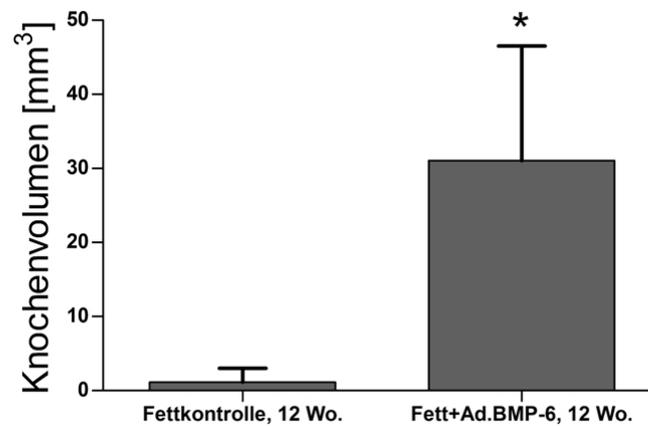


Abbildung 30: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen der Gruppe, welche mit nichtmodifiziertem Fettgewebe (n=8) behandelt wurde und der, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe (n=7) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen zwölf Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate ($p=0,0078$).

Es wird außerdem deutlich, dass die Gruppe der unbehandelten Defekte mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen ($n=8$) ein signifikant höheres Knochenvolumen ($p=0,0078$) im Vergleich zu der mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten und sechs Wochen beobachteten Versuchsgruppe ($n=7$) zeigt. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 31 veranschaulicht.

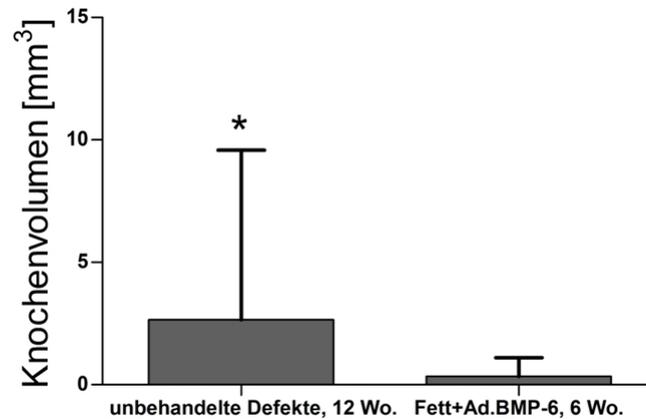


Abbildung 31: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den unbehandelten Defekten ($n=8$) und der Versuchsgruppe, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe ($n=7$) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug bei den unbehandelten Defekten zwölf Wochen und in der anderen Gruppe sechs Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen bei den unbehandelten Defekten ($p=0,0078$).

Die folgende Abbildung 32 verdeutlicht das signifikant höhere Knochenvolumen ($p=0,0078$) in der Gruppe der mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten und zwölf Wochen beobachteten Tiere ($n=7$) im Vergleich zu den unbehandelten Defekten ($n=8$), welche ebenfalls zwölf Wochen beobachtet wurden.

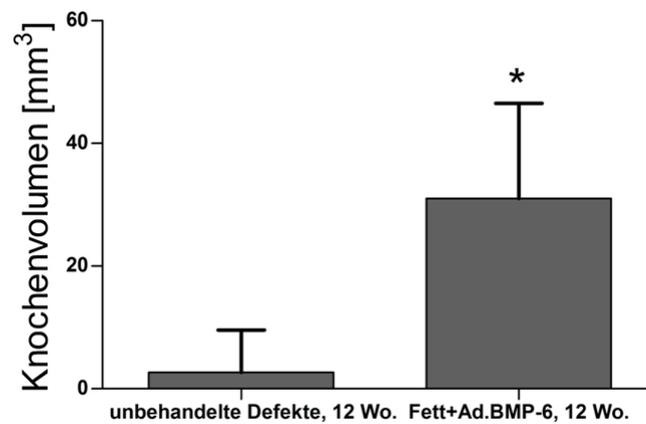


Abbildung 32: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den unbehandelten Defekten ($n=8$) und der Versuchsgruppe ($n=7$), die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen zwölf Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate ($p=0,0078$).

Beim Vergleich der beiden mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten und sechs (n=7) bzw. zwölf Wochen (n=7) beobachteten Versuchsgruppen zeigt sich, dass auch hier das Knochenvolumen nach zwölf Wochen signifikant höher ist ($p=0,0078$) als nach sechs Wochen. Die grafische Darstellung hierzu zeigt Abbildung 33.

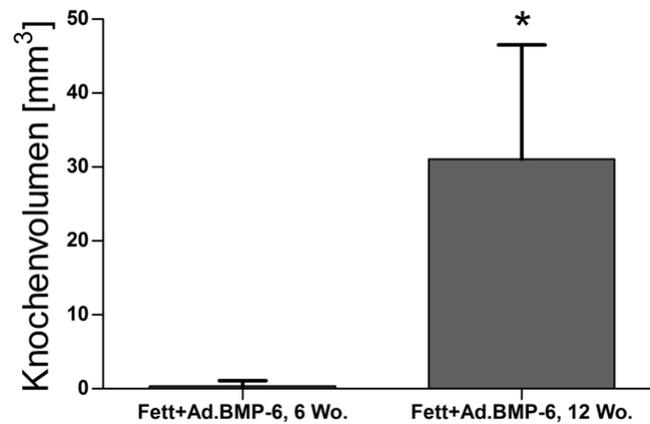


Abbildung 33: Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den Versuchsgruppen, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in der einen Gruppe sechs Wochen (n=7) und in der anderen Gruppe zwölf Wochen (n=7). Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate nach zwölf Wochen ($p = 0,0078$).

3.4 Biomechanik

Mit Hilfe der biomechanischen Messung wurde in dieser Arbeit eine quantitative Größe genutzt, welche Aussagen über die Qualität des neu gebildeten Knochens zulässt. Hierzu wurde das Torsionsmoment gemessen, welches aufgebracht werden muss, um an den Knochen einen Torsionsbruch herbeizuführen.

In dieses Auswerteverfahren wurden zum einen die fünf Femora, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden und eine knöcherne Durchbauung des Defekts aufwiesen, eingeschlossen. Zum anderen wurde die Methode bei sechs gesunden Femora angewendet, welche von der Gegenseite entnommen wurde.

In Abbildung 34 wird ersichtlich, dass die intakten Knochen im Durchschnitt bei einem etwas höheren Torsionsmoment (540Nmm bis 730Nmm) brechen, als die die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurden (100Nmm bis 670Nmm). Des weiteren weist die Kontrollgruppe weniger Streuung auf.

Noch geringer sind die Unterschiede bei Betrachtung der Steifigkeit (siehe Abb. 35). Hier liegt der mittlere Wert bei den Knochen, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, bei 36,4Nmm/deg +/- 0,886Nmm/deg, wohingegen die intakten Knochen eine mittlere Steifigkeit von 41,67Nmm/deg +/- 4,773Nmm/deg aufweisen. Veranschaulicht wird dieses Ergebnis in Abbildung 35.

Bei der statistischen Auswertung zeigt sich sowohl bei Betrachtung der maximalen Torsion als auch bei der Steifigkeit kein signifikanter Unterschied ($p=0,4373$ bzw. $p=0,2752$) zwischen der Versuchsgruppe und den intakten Femora. Dies unterstreicht die Tatsache, dass der mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe gebildete Knochen, den intakten Femora in Sachen maximale Torsion bzw. Steifigkeit in den Einzelwerten zwar nach zwölf Wochen noch unterlegen ist, der Unterschied aber dennoch nicht sehr groß ist.

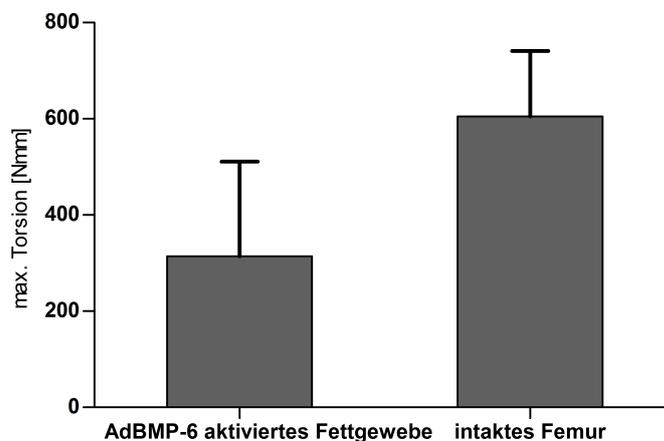


Abbildung 34: Vergleich der maximalen Torsion der Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden ($n=5$) mit den intakten kontralateralen Knochen ($n=6$). Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,4373$).

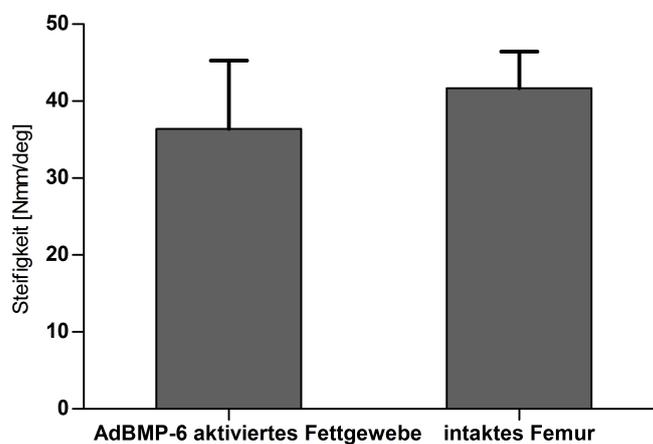


Abbildung 35: Vergleich der Steifigkeit der Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden ($n=5$) mit den intakten kontralateralen Knochen ($n=6$). Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,2752$).

3.5 Histologie

Die histologischen Bilder, welche im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, sollen die Ergebnisse des MicroCTs ergänzen und werden daher rein deskriptiv ausgewertet. Gefärbt wurden die histologischen Schnitte mit Safranin-O-Lichtgrün. Die einzelnen Bilder wurden bei einer 25fachen Originalvergrößerung angefertigt und schließlich zu einem Bild zusammengesetzt.

Auf der folgenden Abbildung sind histologische Schnitte von Femora aus der Gruppe der Leerdefekte zu sehen. Der Defektspalt ist nur auf einem der Bilder abgrenzbar, auf dem zweiten Bild ist nur ein Knochenende zu sehen. Dieses erscheint jedoch abgerundet und durch Kortikalis verschlossen. Abbildung 37 zeigt histologische Schnitte von drei Femora, welche alle der Gruppe der mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelten Knochen angehören und sechs Wochen beobachtet wurden. Hier ist im Defekt (schwarz eingerahmt) Fettgewebe zu sehen, allerdings finden sich weder Knorpel noch Knochen. Die Knochenenden erscheinen zum Defekt hin abgerundet und durch Knochen verschlossen. Auf keinem der Bilder ist eine knöcherne Überbrückung des Defekts zu erkennen. In Abbildung 38 sind Femora zu sehen, die ebenfalls zu der Gruppe gehören, welche mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelt wurde, aber zwölf Wochen beobachtet wurden. Auch hier befindet sich in keinem der Defekte (schwarz eingerahmt) Knorpel oder Knochen. Die Defekte sind alle mit Fettgewebe ausgefüllt und in keinem der Fälle knöchern überbrückt. Abbildung 39 stellt drei Femora dar, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Hier ist kein Unterschied zu den vorangegangenen Abbildungen zu sehen. Man kann das Fettgewebe im Defekt (schwarz eingerahmt) erkennen und sieht, dass in keinem Fall ein Bridging stattgefunden hat. Ebenso ist kein Knorpelgewebe im Defekt erkennbar. In der folgenden Ansicht (Abb. 40) werden drei Femora gezeigt, die, wie die drei vorangegangenen, mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden. Der Beobachtungszeitraum betrug in diesen Fällen allerdings zwölf Wochen. Bei allen drei Schnitten ist eine knöcherne Überbrückung des Defekts (schwarz eingerahmt) zu erkennen, welche beim zweiten (B) am ausgeprägtesten zur Darstellung kommt. Der verbleibende Spalt hat sich deutlich verkleinert und beträgt nun nur noch wenige Micrometer. Das Gewebe dort besteht größtenteils aus Bindegewebe, mit knorpeligen (roten) Anteilen, welche besonders gut auf dem ersten Bild (A) zur Geltung kommen.

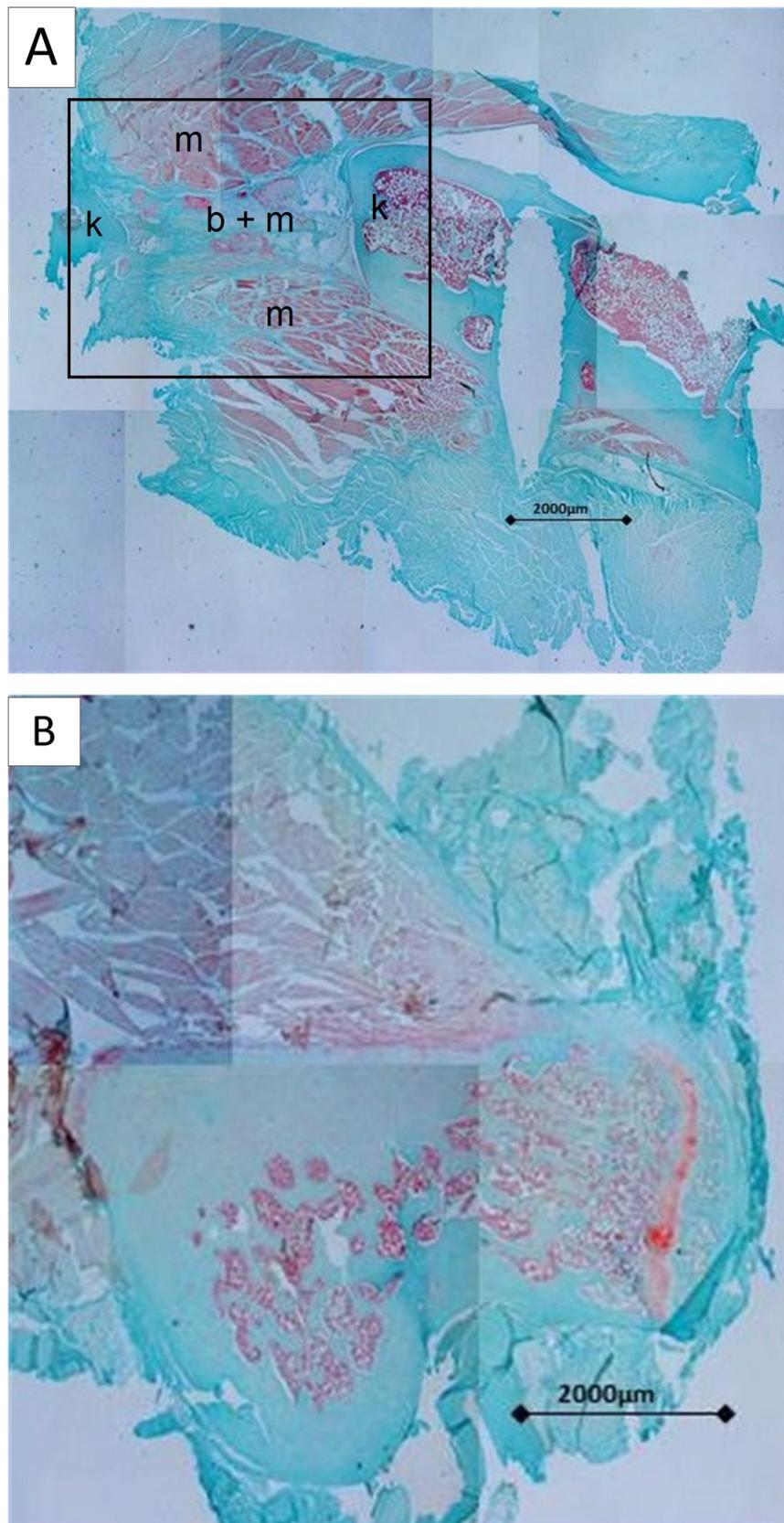


Abbildung 36: Histologische Schnitte von zwei Femora aus der Gruppe der unbehandelten Defekte mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Bindegewebe und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel

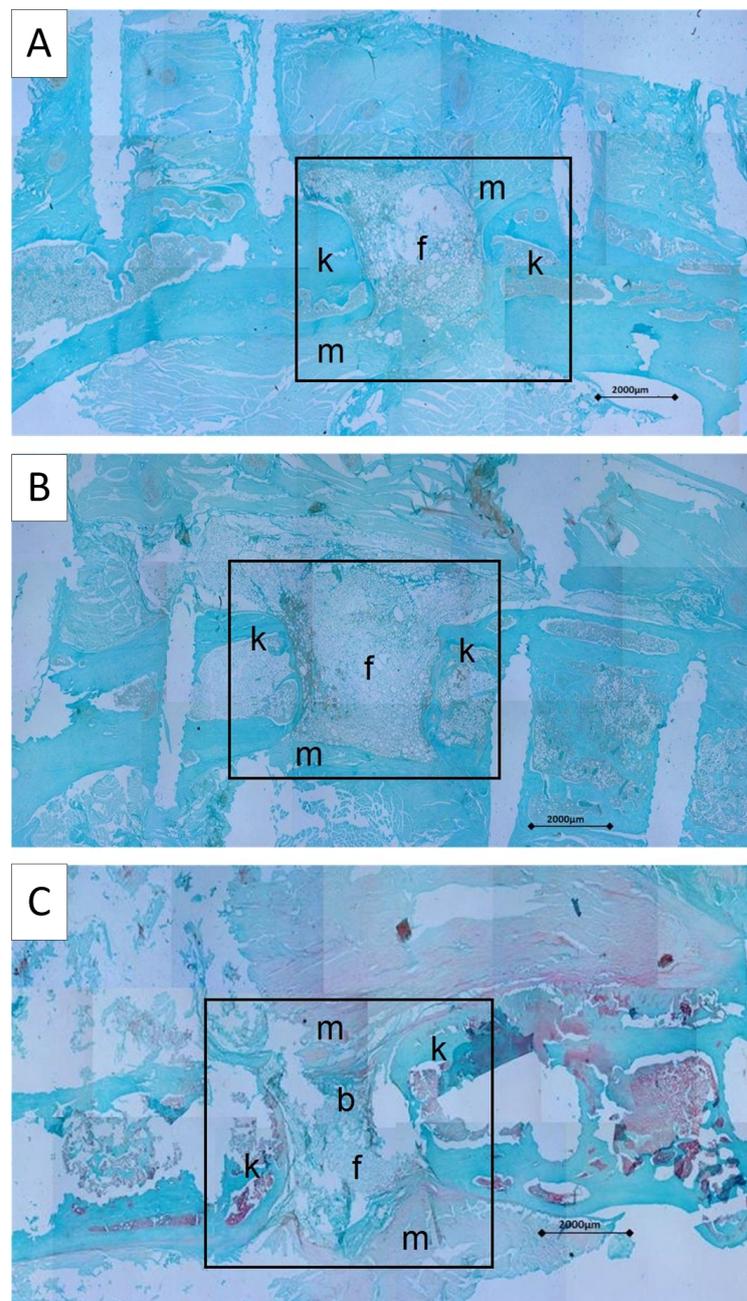


Abbildung 37: Histologische Schnitte von drei Femora aus der Gruppe der mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelten Knochen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Fett und Bindegewebe. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel

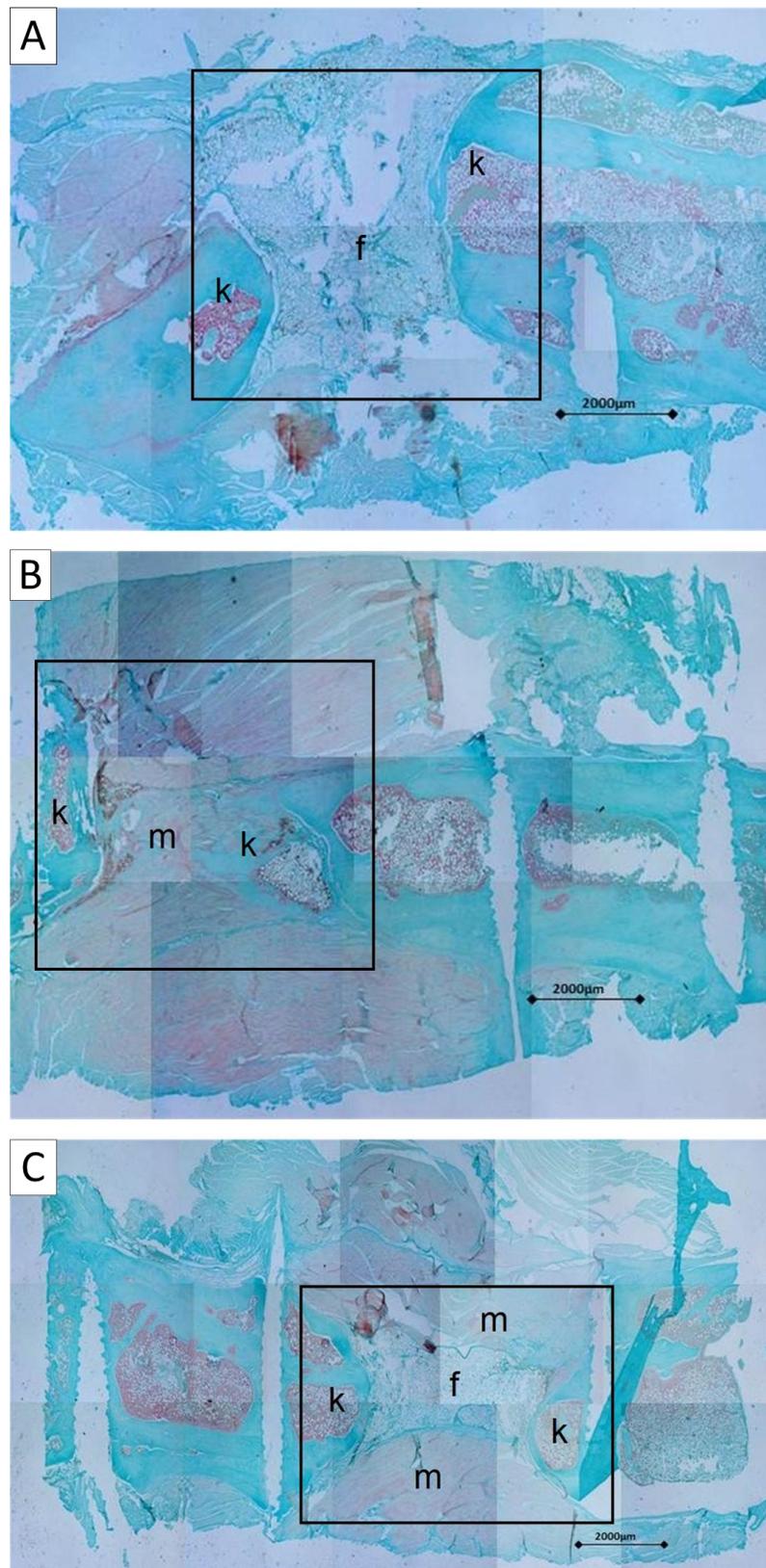


Abbildung 38: Histologische Schnitte von drei Femora aus der Gruppe der mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelten Knochen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Fett und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, k=Knochen, m=Muskel

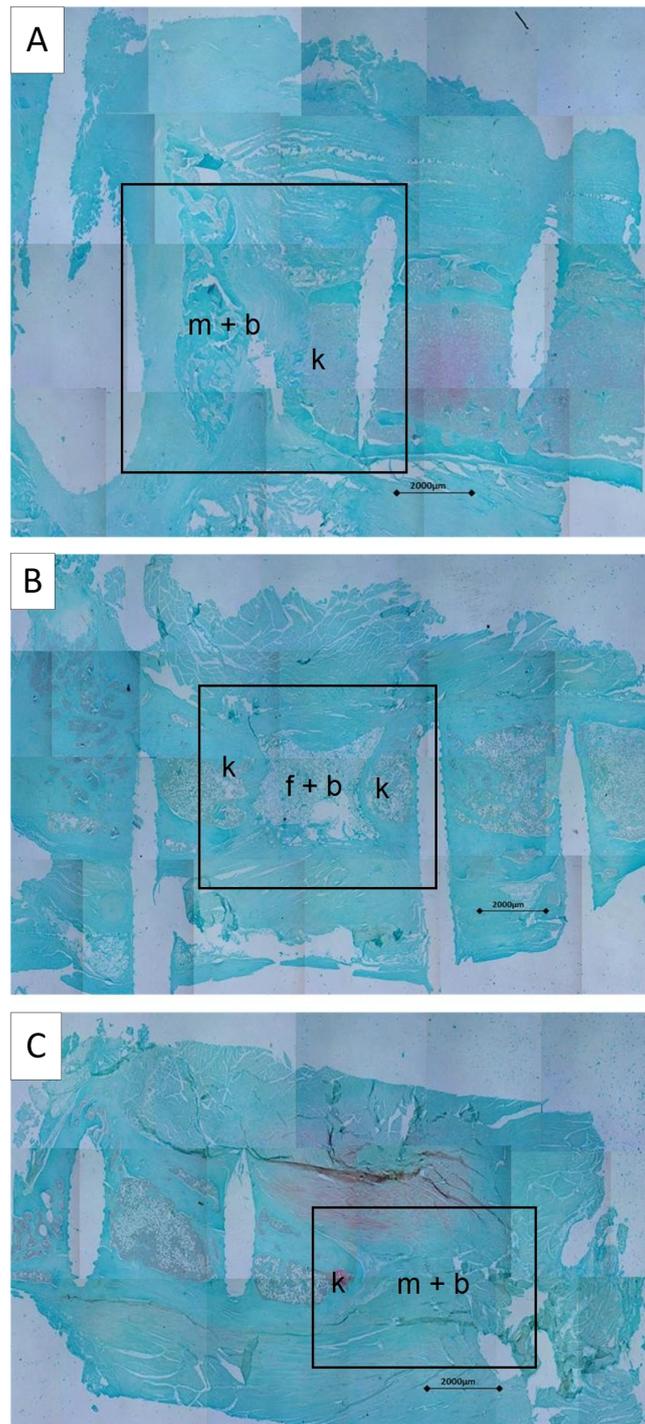


Abbildung 39: Histologische Schnitte von drei Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Der Beobachtungszeitraum betrug sechs Wochen. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Bindegewebe, Fett und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel

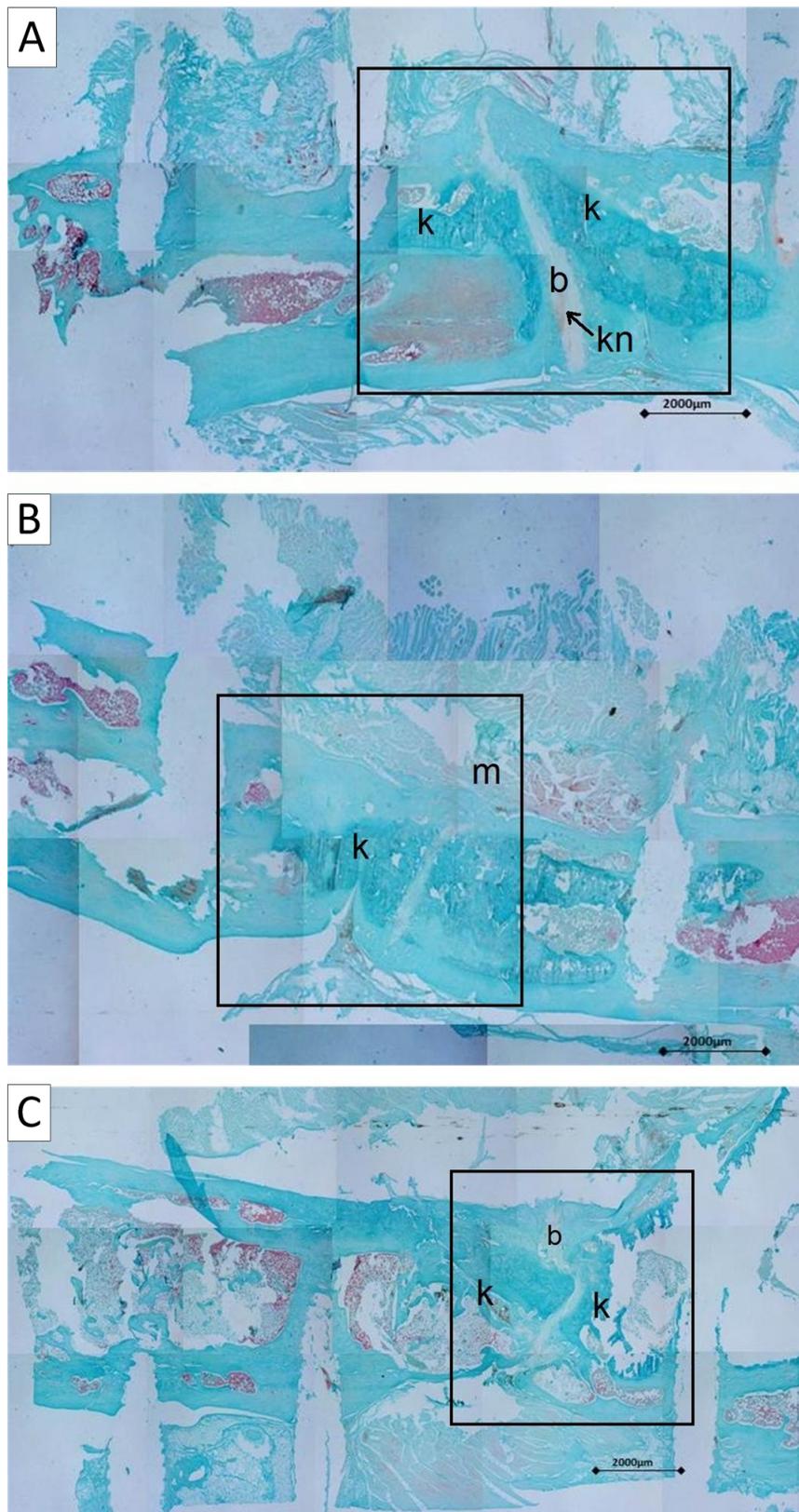


Abbildung 40: Histologische Schnitte von drei Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Der Beobachtungszeitraum betrug zwölf Wochen. In allen drei Fällen wurde der Defekt knöchern überbrückt. Im Spalt befindet sich Bindegewebe gespickt mit Knorpel. Originalvergrößerung 25x. b=Bindegewebe, k=Knochen, kn=Knorpel, m=Muskel

3.6 ELISA

Mit Hilfe dieses Nachweisverfahrens konnte gezeigt werden, dass die Fettzellen, welche mit dem Vektor AdBMP-6 transduziert wurden, in vitro BMP-6 produzieren. Die Proteinbildung beginnt bereits unmittelbar nach der Transduktion und steigt dann im Verlauf recht schnell und stark an. Am vierten Tag nach der Transduktion beträgt die Konzentration schon 1.101,9pg/ml und erreicht nach sieben Tagen mit 1.191,8pg/ml ihren Höhepunkt. Im Anschluss daran nimmt die Bildung von BMP-6 in den Zellen wieder ab, bis sie schließlich am 18. Tag nach der Transduktion ganz zum Erliegen kommt.

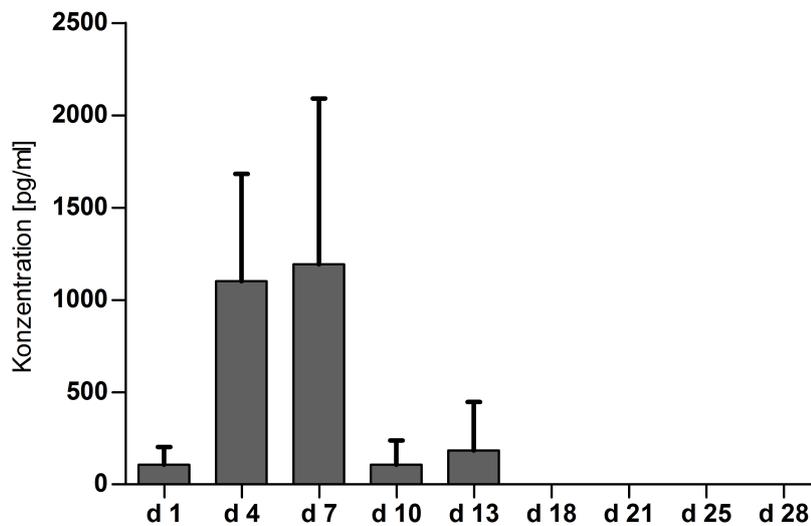


Abbildung 41: BMP-6-Konzentration nach Transduktion von Fetttransplantaten in vitro, welche 28 Tage kultiviert wurden. Die Messung erfolgte mittels ELISA aus Medium, welches alle drei Tage gewechselt und archiviert wurde. Die BMP-6-Produktion der Fettzellen versiegte zwischen Tag 13 und Tag 18 und erreichte ihren Höhepunkt um Tag 7.

4 Diskussion

Angesichts des zunehmenden Alters unserer Bevölkerung steigt auch die jährliche Zahl an Knochendefekten. Im Jahre 2004 betrug allein die Inzidenz für Frakturen der Hüfte 140,9 pro 100.000 Einwohner in Deutschland. [46] Ein wesentlicher Risikofaktor, gerade im Alter einen Knochenbruch zu erleiden, ist die Osteoporose. Die Prävalenz bei über 50-Jährigen an Osteoporose erkrankt zu sein beträgt dabei 14%. [38] Angesichts dieser Zahlen ist es enorm wichtig, eine optimale Versorgung von Patienten mit Knochendefekten zu gewährleisten.

Des Weiteren sind Diabetes mellitus und Durchblutungsstörungen nur zwei der zahlreichen Risikofaktoren, dass ein Knochenbruch gar nicht oder nur verzögert heilt. Auch diese Zahlen wuchsen angesichts der steigenden Prävalenz solcher „Volkskrankheiten“ in den letzten Jahren. [51, 76]

All diese Probleme stellen eine immense Belastung für unser Gesundheitswesen dar und schränken die Patienten in ihrer Lebensqualität stark ein. Darum ist es enorm wichtig die Knochendefektheilung zu optimieren.

Die Knochenheilung stellt ein komplexes und störanfälliges System aus zellbiologischen, biochemischen und biomechanischen Faktoren dar. Neben Osteoblasten sind auch Osteoklasten wichtige Zellen für die Wiederherstellung der Widerstandsfähigkeit des Skeletts. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Wachstumsfaktoren, welche bei der Frakturheilung unabdingbar sind. Angefangen bei VEGF, welches die Angiogenese und damit die Blutversorgung des Defekts sicherstellt, bis hin zu BMPs, die das Knochenwachstum anregen und steuern. [89] Aus biomechanischer Sicht ist es wichtig, dass die Fraktur während der Heilung ausreichend ruhig gestellt ist. Ansonsten kann die Kontinuitätsunterbrechung nicht behoben werden. Ist dieses filigran abgestimmte Zusammenspiel aus zellbiologischen, biochemischen und biomechanischen Faktoren in irgendeiner Art und Weise gestört, so treten vermehrt Pseudarthrosen auf. [44]

Der derzeitige Standard bei der Behandlung von Nonunions stellt die Transplantation von autologem Knochen dar. Durch die begrenzte Verfügbarkeit und die Komorbidität an der Entnahmestelle ist dies jedoch keine optimale Lösung. [63, 65, 23] Andere chirurgische Verfahren wie der Segmenttransport sind hingegen mit einem hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden. [65] Weiterhin werden auch allogene Transplantate verwendet, die durch die aufwendige Konservierung jedoch Qualität einbüßen und teuer sind. Des Weiteren fallen sie regional sehr unterschiedlich an. [[71] siehe Kapitel 4.2 & 4.3 & 4.5] Angesichts dieser Probleme wurden in den letzten Jahren im Tissue engineering immer wieder neue Therapieansätze generiert. So zum Beispiel rekombinante humane Wachstumsfaktoren, welche mit Hilfe verschiedener Trägersubstanzen in den Defekt eingebracht werden und so das

Knochenwachstum anregen sollen. [116] Da die Herstellung dieser Medikamente aber sehr aufwendig und teuer ist und zudem sehr hohe Dosen benötigt werden, um eine Frakturheilung zu induzieren, ist es nötig diesen durchaus guten Ansatz weiterzuentwickeln.

Hierzu wurde in dieser Studie zunächst ein Vektor generiert, mit welchem die genetische Information für einen Wachstumsfaktor (BMP-6) in Fettzellen transferiert werden kann. Danach wurde in das Femur von Fischer 344 Ratten ein Defekt gesetzt, welcher mit genmanipuliertem Fettgewebe gefüllt wurde. Nach Beobachtung über zwei verschiedene Zeiträume erfolgte im Anschluss die Auswertung der Versuche mittels MicroCT, biomechanischem Torsionstest und Histologie.

Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, neue Materialien bzw. Wege zum Ersatz von verloren gegangenen Knochen zu testen und zu untersuchen.

4.1 Transplantat

Gibt es sechs Monate nach einer Fraktur noch keine Anzeichen für eine Heilung, so spricht man von einer Pseudarthrose. Der Standard in der Behandlung eines solchen Krankheitsbildes stellt heute die autologe Knochentransplantation dar. Es wird dabei Knochen, meist aus dem Beckenkamm, entnommen und in den Frakturspalt transplantiert. Dieser hat dort sowohl osteoindutive als auch -konduktive Wirkung. Er überbrückt zum einen den vorhandenen Spalt und bewirkt so, dass die von den vitalen Knochenenden einwachsenden Osteoblasten eine Leitstruktur haben. Zum anderen setzt das Transplantat Wachstumsfaktoren, wie Bone morphogenetic proteins frei, welche die Knochenzellen zur Immigration in das Frakturgebiet motivieren. Außerdem enthält das Knochenmark pluripotente Stammzellen, welche zu Knochenzellen differenzieren und so den Frakturspalt füllen. Ein Problem dieser Therapie stellt jedoch die hohe Komorbidität durch den Eingriff an der Entnahmestelle dar. Etwa ein Drittel der Patienten klagt über Schmerzen oder Parästhesien. Des weiteren ist die Erfolgsrate dieses Behandlungsansatzes nicht sehr hoch, so bleibt die Pseudarthrose in einigen Fällen auch nach einem solchen Eingriff bestehen. [2, 23, 63, 65, 108]

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Allografts. Hierbei ist kein zusätzlicher Eingriff notwendig, wodurch auch keine zusätzlichen Schmerzen auftreten. Allerdings ist der Vorrat solcher Transplantate begrenzt, deren Aufbereitung aufwendig und so das Implantat teuer. Außerdem geht durch die Behandlung des Spenderknochens dessen osteoinduktives Potenzial verloren, womit das Transplantat lediglich als Leitstruktur dienen kann. Des weiteren besteht trotz aufwendiger Aufbereitung und diverser Kontrollmechanismen die Gefahr der Übertragung von Krankheiten. [[71] siehe Kapitel 4.2 & 4.3 & 4.5]

Eine interessante und vielversprechende Therapiealternative stellen Wachstumsfaktoren dar. Sie können gentechnisch hergestellt, auf verschiedene Träger gebracht oder direkt implantiert werden. Jedoch ist deren Einsatz umstritten, da vor allem bei der direkten Einbringung in den Defektspace eine vielfach höhere Dosis als die natürliche verwendet werden muss, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen. Dies treibt zum einen die Kosten in die Höhe und steigert zum anderen das Risiko ektoper Knochenbildung. [96, 98, 115]

Für die Kombination von Wachstumsfaktoren und Knochenmark gibt es verschiedene Ansätze. Letzteres enthält dabei eine große Anzahl an pluripotenten Stammzellen, welche zu Knochenzellen differenzieren können. [60] Das Problem bei diesem Konzept ist jedoch, dass die Entnahme von Knochenmark aufwendig und mit deutlich erhöhter Komorbidität verbunden ist. Eine Lösung dieses Problems stellen adulte Stammzellen aus mesenchymalen Geweben dar. Sie sind in der Regel mit deutlich weniger Aufwand zu entnehmen und

zeigen ein genauso gutes Differenzierungspotenzial. [68]

Um die Dosis an Wachstumsfaktor zu verringern, den Frakturenden eine Brücke zu bieten und gleichzeitig Stammzellen in den Frakturspalt einzubringen, wurde in der hier vorgestellten Studie Fettgewebe mit Hilfe eines Vektors genetisch so manipuliert, dass es den Wachstumsfaktor BMP-6 bildet. Autologes Fettgewebe ist leicht zu gewinnen, es kommt im menschlichen Körper in ausreichender Menge vor und kann schnell nachgebildet werden. Außerdem geht die Entnahme mit geringen Morbidität einher. In der plastischen Chirurgie sowie in der Dermatologie sind autologe Fetttransplantationen schon seit Jahren gängige Praxis und haben sich bewährt. Ein weiterer Vorteil von Fettgewebe als Trägermaterial liegt im Vorhandensein von pluripotenten Stammzellen, welche zu Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren und so helfen den Substanzverlust im Frakturspalt auszugleichen. [6, 20, 34, 42, 66, 92] Fettgewebe besitzt im Vergleich zu Knochentransplantaten eine geringere Festigkeit. Durch die Fixierung bzw. Stabilisierung mit Hilfe üblicher Osteosynthesetechniken wird aber der Einsatz von Fetttransplantaten auch in lasttragenden Bereichen ermöglicht.

4.2 Wachstumsfaktor

Die Knochenheilung wird durch ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Wachstumsfaktoren gesteuert. Hierzu gehören solche, die das Einwachsen von Gefäßen stimulieren wie VEGF [17] oder FGF, das Fibroblasten anregt, aber auch BMPs. [12] Als mögliche Therapieoption sind BMPs am weitesten verbreitet. Zu dieser Proteingruppe gehören 20 Moleküle, welche der TGF- β -Familie untergeordnet sind. Zahlreiche dieser Eiweiße sind an der Entstehung und Regeneration von Knorpel und Knochen beteiligt, wobei BMP-2, -4, -5, -6, -7 und -9 das größte osteogene Potenzial aufweisen. So induzieren z.B. BMP-2 und BMP-7 die Ausschüttung diverser Transkriptionsfaktoren in mesenchymalen Stammzellen, wodurch diese zu Osteoblasten differenzieren. [112] 2004 testeten Kang et al. 14 verschiedene BMPs hinsichtlich ihrer Osteoinduktivität. Es wurde gezeigt, dass vor allem BMP-2, -6 und -9 die Bildung von Knochen anregen, zu einem geringeren Teil auch BMP-4 und -7. Auf diese Proteine stützte sich dann die weitere Forschung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen drei Jahre später auch Luu et al.. [58] Aktuell gibt es BMP-2 und -7 als Medikamente auf dem Markt, allerdings ist deren Herstellung aufwendig und somit teuer. Des Weiteren wird bei der Therapie eine hohe Dosis dieser Wachstumsfaktoren benötigt, was die Anwendung unsicher macht.

Betz et. al. konnten im Tiermodell bereits zeigen, dass es möglich ist die genetische Information von BMP-2, -7 und -9 in Fett- bzw. Muskelgewebe einzubringen, welches, implantiert in einen kritischen Defekt, zur Heilung desselben führte. [5, 6] In verschiedenen Studien ließ sich außerdem nachweisen, dass BMP-6 ebenfalls ein sehr großes osteoinduktive Potenzial hat. Luu und Gitelman zeigten durch Transduktion verschiedener Zelltypen mit Vektoren, welche BMP-6 exprimierten, dass so die osteogene Differenzierung angeregt werden kann. [37, 58]

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde eine Überführung der genetischen Information für BMP-6 mit Hilfe eines adenoviralen Vektors in Fettzellen erfolgreich durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass der von den Fettzellen produzierte Wachstumsfaktor (BMP-6) nach zwölf Wochen einen kritischen Defekt im Rattenfemur heilen kann.

4.3 Tiermodell

Insbesondere bei der Entwicklung regenerativer Implantate stellen Tiermodelle einen unverzichtbaren Bestandteil dar. In diesem Rahmen ist es wichtig der ethischen Verantwortung gegenüber den Tieren gerecht zu werden und solche Versuche mit der entsprechenden Sorgfalt zu planen und durchzuführen. Zur Untersuchung von Knochendefekten sind Tiermodelle unentbehrlich, sie bieten das nötige biologische Milieu mit Osteoblasten und Osteoklasten sowie essenziellen Faktoren für das Remodelling einschließlich Angiogenese, Wachstumsfaktoren, mechanischen Stimuli und vielen anderen. Wichtig für die Suche nach einem optimalen Modell sind vor allem die Parallelität mit klinischen Fällen bezüglich des Defekts, die Verwendung von Osteosynthesematerialien, wie sie auch in der Klinik gebraucht werden, die Möglichkeit, dass die Tiere die Extremität belasten können, die Aussicht auf eine suffiziente Angiogenese, die Existenz der für die Regeneration benötigten Zellen und die möglichst geringe Belastung für das Tier. [45] Darüber hinaus soll in der Fragestellung dieser Arbeit der neugebildete Knochen quantifiziert und hinsichtlich seiner biomechanischen Eigenschaften untersucht werden. Möglich wird dies nur in einer klinisch realistischen Situation in einem intakten Organismus, da insbesondere physiologische Druck- und Zugbeanspruchungen *in vitro* schwer zu simulieren sind. In der Zellkultur können lediglich intra- bzw. interzelluläre Stoffwechselfvorgänge untersucht werden, welche einer sehr starken Normierung unterliegen. Dies stellt kein adäquates Modell für die vielfältigen Situationen nach einem Trauma in der Klinik dar. [101]

In den meisten Arbeiten werden Ratten oder Kaninchen verwendet. Nagetiere bieten den entscheidenden Vorteil, dass nicht nur ihre Haltungskosten äußerst gering sind, sondern ihre Heilung auch innerhalb kürzerer Zeit erfolgt, als die von Defekten in größeren Säugetieren, wie zum Beispiel Schafen. Das Femur der Ratte ist mit 30 - 40mm Länge groß genug um gut daran arbeiten zu können und dennoch sind die Haltungskosten verhältnismäßig gering. Bei Kaninchen ist der Aufwand bezüglich Haltung und Operation hingegen deutlich größer. Für initiale Untersuchungen sind Nagetiere akzeptabel, so lässt sich aus verschiedenen Ansätzen der erfolgreichste selektionieren. Im Anschluss daran erfolgt dann die Evaluation im Großtiermodell.

In vielen Arbeiten kommen Sprague-Dawley-Ratten zum Einsatz, [11, 114] welche im Alter von zwölf Wochen ein Körpergewicht von mehr als 400g erreichen [40] und hinsichtlich ihrer charakterlichen Eigenschaften als sehr umgänglich gelten. In dieser Studie wurden jedoch Fischer 344 Ratten verwendet. Sie sind mit einem durchschnittlichen Gewicht von 275g, im Alter von zwölf Wochen, deutlich kleiner. [41] Diese Ratten gehen auf einen Züchter mit dem Namen Fischer zurück und wurden erstmals 1920 an der Columbia University als Inzuchtstamm etabliert. Für die biomedizinische Forschung sind diese Tiere deshalb

interessant, weil sie durch Inzucht genetisch sehr einheitlich sind. Hierdurch ist es möglich Transplantationen innerhalb dieses Stamms durchzuführen, ohne Abstoßungsreaktionen fürchten zu müssen. [99]

So konnte in dieser Studie zu Beginn einer Versuchsreihe einem Spendertier Gewebe entnommen werden und im Anschluss den Versuchstieren implantiert werden. Dieses Vorgehen ist mit deutlich weniger Aufwand verbunden. Darüber hinaus ist es wesentlich schonender für die Tiere, da sie sich nur einem Eingriff unterziehen müssen und nicht zwei belastende Narkosen durchmachen müssen. Des Weiteren wird der Versuchsaufbau durch dieses Konzept weiter standardisiert und weniger fehleranfällig. Alle Tiere innerhalb einer Versuchsgruppe erhielten dadurch das Fettgewebe eines Spendertieres, welches, je nach Gruppenzugehörigkeit, zuvor mit dem Vektor (Ad.BMP-6) behandelt wurde. Trotz der sorgfältigen Vorbereitung und Planung, fielen zwei von acht Tieren der ersten Operationsserie am ersten postoperativen Tag aus. Vermutlich waren diese Ausfälle auf eine perioperative Unterkühlung zurückzuführen. Durch den Einsatz von Wärmematten konnte im Folgenden die Körpertemperatur während der Operation konstant gehalten werden, was für die Tiere deutlich schonender war. In den folgenden Operationsserien konnte so ein weiterer Ausfall vermieden werden.

4.4 Defektmodell

Das Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob es möglich ist, durch genmanipuliertes Fettgewebe einen kritischen Knochendefekt zur Ausheilung zu bringen. Ein kritischer Knochendefekt ist definiert als das Fehlen von überbrückendem Knochen bzw. als das Fehlen eines Kallus im Bereich der Knochenenden. Stattdessen ist der Defekt häufig mit Bindegewebe, Fett oder Muskel gefüllt. Um eine solche Kontinuitätsunterbrechung herbeizuführen gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder der Knochen wird traumatisch gebrochen oder osteotomiert. Für die Osteotomie werden verschiedene Methoden wie Sägen oder Zahnarztbohrer verwendet. [45] Je nach Spezies und Stamm bzw. Alter und Gewicht der Tiere variiert die Größe eines kritischen Defekts. Am Femur der Ratte beträgt die Länge mindestens 4mm. Um sicher zu gehen, dass es sich tatsächlich um einen Defekt kritischer Größe handelt, werden in der Regel 5mm angestrebt, was sowohl in dieser, als auch in zahlreichen anderen Arbeiten nachgewiesen wurde. [13, 31, 45, 103] Auch nach zwölf Wochen ist in der hier vorgestellten Arbeit ein 5mm großer Defekt nicht knöchern überbrückt. Die Defektenden scheinen im MicroCT abgerundet und verschlossen.

Neben der Länge des Defekts ist insbesondere das sorgfältige Entfernen des Periosts wichtig, sodass keine Periostbrücke zwischen den Knochenenden verbleibt. Street et al. konnten zeigen, dass die Knochenhaut eine erhebliche Rolle in der Frakturheilung spielt, wodurch bei nicht sorgfältiger Entfernung die Ergebnisse verfälscht würden. [91]

Die hier verwendete Defektlänge von 5mm entspricht etwa 15% der gesamten Knochenlänge, ein vergleichbarer Defekt im Oberschenkelknochen eines Menschen mit einer Länge von 450mm würde ca. 70mm ergeben. Beträgt die Größe des Defekts weniger als 4mm, kann nicht unterschieden werden, ob der Knochen durch die natürliche Heilung oder die angewendete Therapie geheilt wurde. Durch dieses standardisierte Verfahren ist eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet, wenngleich das Modell nicht sehr nah an der Realität angesiedelt ist, wo Frakturen morphologisch sehr unterschiedlich sind.

Ausschlaggebend für die problemlose Testung der angewendeten Methode ist außerdem eine gute Stabilisation der Defektzone. Hierfür werden verschiedenste Osteosynthesesysteme in der Literatur beschrieben. [26] Das in dieser Studie verwendete interne Fixateursystem aus vier Kirschnerdrähten und zwei Platten ist in dieser Arbeitsgruppe etabliert und hat sich als sehr gut erwiesen. [5, 6] Die Ratten tolerierten die entstandene Beule am rechten Hinterlauf gut und es kam bei den Versuchen für diese Arbeit in nur zwei Fällen zu Wundheilungsstörungen. In keinem der Fälle versagte das Implantat in Form eines Implantatbruchs, sodass eine optimale Stabilisierung der Defektzone gewährleistet werden konnte. Im Vergleich zu anderen Systemen beeinflusst dieses die Defektheilung kaum. Marknägel zum Beispiel bedingen aufgrund ihrer intraossären Lage Probleme bei

der biomechanischen Testung und lassen bei der CT-morphologischen Beurteilung der Röhrenknochen keine genauen Ergebnisse zu. Ebenso wachsen Osteosyntheseplatten bei der Defektheilung häufig in den Knochen ein, wodurch wiederum keine verlässlichen Ergebnisse bei der biomechanischen Testung erzielt werden können. Außerdem kann durch ihre sehr enge Verbindung mit den Knochenenden im Versuch nicht ausgeschlossen werden, ob sie nicht als Leitschiene für den neu entstehenden Knochen dienen. Eine weitere Möglichkeit der Defektstabilisierung stellen externe Fixateure dar. Bei deren Verwendung kommt es jedoch im Vergleich zu internen Systemen, durch die exponierte Lage der Pins, häufiger zu Infektionen.

4.5 Auswerteverfahren

4.5.1 MicroCT

Ein Hauptkriterium für die Beurteilung der erzielten Qualität der Defektheilung ist die Quantifizierung des Knochenvolumens sowie die Beschreibung der Morphologie innerhalb der Defektzone nach sechs bzw. zwölf Wochen. In der Klinik werden zur Verlaufsbeurteilung einer Fraktur Röntgenkontrollen in mehreren zeitlichen Abständen zum ursprünglichen Trauma angefertigt. So kann beurteilt werden, ob und wenn ja wieviel Knochen in einem Zeitraum ungefähr gebildet wurde. In vielen Studien werden diese Röntgenkontrollen ebenso angewendet. Die Ungenauigkeit der Aussagen stellt hierbei jedoch ein großes Problem dar. So ist eine genaue Aussage zur Überbrückung eines Defekts aufgrund der Zweidimensionalität nicht möglich. Außerdem bleibt auch bei verblindeter Beurteilung nach standardisierten Scoresystemen die Tatsache bestehen, dass die Auswertung diversen subjektiven Einflüssen unterliegt. Darüber hinaus lieferten Friedlaender et al. 2001 Hinweise, dass die Röntgenbilder von Defekten, welche unter Einsatz von Wachstumsfaktoren therapiert wurden, nicht unbedingt mit dem klinischen Outcome übereinstimmen. [35] Eine genaue Aussage über die Menge des neugebildeten Knochens ist mit Röntgenaufnahmen aufgrund ihrer Zweidimensionalität ebenso wenig möglich, wie die Beurteilung der Qualität. Es kann nicht sicher festgestellt werden, ob der Defekt tatsächlich überbrückt ist oder ob es sich lediglich um Überlagerungen handelt.

So bleibt zur sicheren Auswertung nur die Computertomographie, welche in dieser Arbeit aufgrund der geringen Größe der Rattenfemora als MicroCT durchgeführt wurde. Hierbei werden Dichtewerte größer 500 Hounsfield-Einheiten dem Knochengewebe zugeordnet, wodurch Weichteile herausgerechnet werden können und lediglich der Knochen auf dem Bild sichtbar ist. [39] So kann die äußere Morphologie der Defektzone durch Drehen des Bildes aus den verschiedensten dreidimensionalen Blickwinkeln betrachtet und beurteilt werden. Ferner kann das Bild in beliebigen Ebenen geschnitten werden. Es ist überdies möglich die Qualität des Materials innerhalb der Defektzone zu begutachten. Hierbei kann man zunächst nicht zwischen neugebildetem Knochen und Knochensplintern unterscheiden, welche beim Fräßen des Defekts entstehen. Häufig gelingt dies aber durch die Untersuchung der Innenarchitektur, so lässt sich der neu gebildete Knochen beurteilen. Überdies können infolgedessen Aussagen darüber getroffen werden, ob bereits wieder der physiologische Aufbau des Röhrenknochens vorliegt.

Im Rahmen der computertomographischen Auswertung wurde zudem 1,5mm ober- und unterhalb der Mittellinie des Defekts das Knochenvolumen bestimmt. Durch die genaue Quantifizierung des Knochenanteils in einem exakt definierten Defektbereich kann eine

eindeutig reproduzierbare und gut vergleichbare Aussage über die Defektheilung getroffen werden.

4.5.2 Biomechanik

Eine eindeutige Aussage über die Stabilität des neu gebildeten Knochens ist nur mit Hilfe der biomechanischen Testung möglich. Ausschließlich durch dieses Verfahren kann direkt die Festigkeit der beiden Femora verglichen und in Zahlen gefasst werden.

Verschiedene Verfahren hierzu werden in der Literatur beschrieben. Dazu gehören Dreipunktbiegetests, [79] bei denen durch seitliche Krafteinwirkung auf den Knochen ein Bruch herbeigeführt wird. Dabei wird die benötigte Kraft aufgezeichnet und kann im Verlauf mit anderen Ergebnissen verglichen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in Torsionstest, [5] wobei der zu testende Knochen mit seinen Enden fest in eine Halterung gespannt wird und im Anschluss das proximale bzw. distale Knochenende gegen das jeweils andere verdreht wird. Die Kraft, welche aufgebracht werden muss, um den Knochen zu brechen, wird dabei aufgezeichnet und kann in der Folge mit anderen Resultaten verglichen werden.

In der hier vorgestellten Studie entschied man sich zu Durchführung eines Torsionstests, da dieser deutlich weniger störanfällig ist. Bei Biegetests spielt z.B. die Morphologie des Knochens eine große Rolle. Da ein Röhrenknochen kein Rohr mit einem runden Durchmesser darstellt, werden die Ergebnisse von Biegetests maßgeblich durch die Drehung des Knochens während des Versuchs beeinflusst. Hierbei ist es sehr schwierig ein exakt reproduzierbares Ergebnis zu erzielen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die Knochen immer an exakt der gleichen Stelle gebrochen werden müssen, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, was ebenfalls schwierig ist. Bei Torsionstests dagegen hat der morphologische Knochenaufbau weniger Einfluss, wodurch die Reproduzierbarkeit erleichtert wird und die Ergebnisse verlässlicher vergleichbar sind. Der Torsionstest wurde gewählt, da das Messergebnis hierbei weniger stark von der Orientierung des eingespannten Knochens abhängt als beim Biegetest.

4.5.3 Histologie

Mit Hilfe der Histologie ist es möglich im Rahmen verschiedener Färbungen eine Aussage über die Gewebeart und -morphologie im Defekt zu treffen. In dieser Arbeit wurde eine Safranin-O-Lichtgrün-Färbung durchgeführt, welche Polyanionen wie Glykosaminoglykane und Proteoglykane zur Darstellung bringt. Da die Farbintensität direkt proportional zum Glykosaminoglykangehalt des Präparats ist, entspricht eine rote Farbe dem normalen Proteoglykangehalt in Knorpel. Orange bedeutet eine leichte Reduktion desselbigen,

weiß die starke Reduktion und blau/grün entspricht dem Nichtvorhandensein dieser großmolekularen Substanzen. [61, 81] Üblicherweise wird diese Färbung zur Abbildung von Knorpelpräparaten verwendet. Da in dieser Studie davon auszugehen ist, dass sich innerhalb der Defektzone zunächst Knorpel und daraus dann verkalkter Knochen bildet, wurde dieses Verfahren gewählt, um die Heilung des Defekts zu veranschaulichen.

Bei vergleichbaren Studien wurde in der Literatur an entkalkten Präparaten auch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung angewandt, in der ein Überblick über das gesamte Gewebe gegeben werden kann. [5, 53, 83]

In anderen Arbeiten werden die Präparate nicht entkalkt und dann mit der Färbemethode nach Laczko-Levai abgebildet. [79] Dies stellt ein gutes Verfahren zur Beurteilung von Knochenbildung dar, dennoch ist es deutlich ungenauer als die Volumenbestimmung mittels Computertomographie.

In der vorliegenden Arbeit dient die Histologie der Veranschaulichung der computertomographischen Ergebnisse.

4.6 Ergebnisse

4.6.1 ELISA

Mit Hilfe dieses Proteinnachweisverfahrens wird gezeigt, dass die mit Ad.BMP-6 behandelten Fettgewebstückchen *in vitro* tatsächlich BMP-6 produzieren. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch Angaben in der Literatur, wo ähnliche Versuche mit Ad.BMP-2 ähnliche Ergebnisse lieferten. [5, 6] So konnten Betz et al. 2009 mit Hilfe eines ELISAs zeigen, dass neun Tage nach Transduktion von Muskelzellen mit einem adenoviralen Vektor, welcher die genetische Information für BMP-2 enthielt, 5019 ± 3043 pg/ml BMP-2 gebildet wurde. 2010 zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass auch Fettgewebstückchen BMP-2 produzieren, nachdem sie mit Ad.BMP-2 transduziert wurden. Dabei lagen die maximalen Werte an Tag 27 bei 5615 ± 53 pg/ml. Somit unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Studien von denen der hier vorgestellten Arbeit. Das Fettgewebe, welches mit Ad.BMP-2 transduziert wurde, zeigte ab Tag 6 bis zum Ende des Versuchs an Tag 30 konstant mehr als 3000 pg/ml an BMP-2. Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Studie erlischt die BMP-6-Produktion durch Fettgewebe zwischen Tag 7 und 10. Außerdem beträgt die Menge an gebildetem BMP-6 maximal 1191,8 pg/ml. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte in der Transduktionsrate liegen. Möglicherweise wurden bei der Transduktion mit Ad.BMP-6 weniger Fettzellen mit der genetischen Information für BMP-6 versorgt als bei der Transduktion mit Ad.BMP-2. Dies könnte an der Größe der Fettgewebstückchen liegen, je kleiner desto größer ist die Oberfläche und desto mehr Fettzellen können mit dem adenoviralen Vektor in Berührung kommen. Eine andere Erklärung wäre, dass Ad.BMP-2 ein potenterer und widerstandsfähigerer Vektor ist bzw. weniger durch äußere Bedingungen beeinflusst wurde und so mehr Fettzellen transduzieren konnte. Des weiteren ist es möglich, dass 1×10^8 pfu in diesem Fall nicht ausreichen.

4.6.2 MicroCT-Bilder

In dieser Arbeit wird die Hypothese bestätigt, dass mit Hilfe von Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe Knochendefekte kritischer Größe geheilt werden können.

Zunächst wird durch die Gruppe der unbehandelten Defekte ($n=8$) gezeigt, dass es sich in dem verwendeten Modell um einen Defekt kritischer Größe handelt. Wie die Literatur bereits vermuten ließ, wird auch nach zwölf Wochen keiner der Defekte aus dieser Versuchsgruppe (ohne Ad.BMP-6) überbrückt. [5, 31, 45] Die kleinen Knochensplitter, welche in einigen der computertomographischen Bilder (vgl. Abb. 18D) zu sehen sind, entstanden beim Fräßen des Defekts. Trotz sorgfältigen Spülens im Anschluss an diesen Vorgang kann nicht verhindert werden, dass einige Partikel im Defektareal verbleiben. Dies erklärt auch,

warum bei der Messung des Knochenvolumens 1,5mm ober- und unterhalb der Mittellinie des Defekts die Werte nicht Null sind.

Ebenso wird gezeigt, dass das Fettgewebe allein keinen Einfluss auf die Knochenheilung in diesem Versuch hat. Die darin enthaltenen mesenchymalen Stammzellen können zwar zu Knochenzellen differenzieren, [25, 113] tun dies unter physiologischen Bedingungen jedoch offensichtlich nicht in ausreichendem Maße, sodass sich auch in dieser Versuchsgruppe kein überbrückter Defekt finden lässt. Weder nach sechs ($n=6$) noch nach zwölf Wochen ($n=8$) ist ein Anzeichen für die Knochenneubildung in der Defektzone sichtbar. Wie bei den unbehandelten Defekten finden sich aber auch hier Knochensplitter, deren Herkunft auf den Fräßvorgang zurückzuführen ist. Dementsprechend verhalten sich auch die Werte der Knochenvolumenbestimmung und liegen allesamt unter $6mm^3$. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch Angaben in der Literatur. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass natives Fettgewebe im Defektspalt die Knochenheilung nicht beeinflusst. [5, 6, 31, 84] In der Versuchsgruppe, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurde ($n=7$), lässt sich in dieser Arbeit auch kein Anzeichen für Heilung erkennen. Die Bilder weisen keine merklichen Unterschiede zu denen der Kontrollen auf und auch bei der Volumenberechnung liegen weniger als $2,1mm^3$ Knochen innerhalb des Messbereichs vor. In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass nach sechs Wochen kritische Defekte im Rattenfemur, welche mit Ad.BMP-2 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, mit Knochen durchbaut sind. [6] 2011 zeigten Sheyn et al. hingegen, dass Knochendefekte in Wirbelkörpern von Ratten (Durchmesser 1,8mm; Tiefe 2mm) mit Hilfe von Stammzellen aus Fettgewebe, welche nach Nukleofektion mit rhBMP-6-Plasmiden BMP-6 freisetzten, nach sechs Wochen verkleinert waren, jedoch ebenfalls nicht geheilt. [84] Eine Erklärung für die ausbleibende Durchbauung in der hier vorgestellten Arbeit ist, dass der Beobachtungszeitraum von sechs Wochen zu kurz ist. Dagegen spricht jedoch, dass es keinerlei Anzeichen für eine beginnende Heilung gibt. Außerdem zeigten Bertone et al., dass eine ulnare Osteotomie im Kaninchen röntgenologisch bereits nach drei Wochen überbrückt zu sein schien. Eine Woche nach der Osteotomie wurde diese durch Injektion von Ad-BMP-6 in den Osteotomiespalt behandelt. Fünf Wochen nach Injektion war eine Osteotomielinie im Röntgenbild nicht mehr zu sehen. [4] Allerdings lässt das konventionelle Röntgenbild aufgrund seiner Zweidimensionalität hier nur sehr ungenaue Aussagen zu. Laurent et al. zeigten, dass durch Injektion von Ad-BMP-6 nach 14 Wochen eine knöcherne Fusion von Wirbelkörpern in weißen Neuseelandkaninchen zu erzielen ist. [54] Somit liegt die Vermutung nahe, dass in der hier vorgestellten Studie im Rahmen der Transduktion nicht genügend cDNA in die Zellen gelangt ist. Folglich kann nicht ausreichend Wachstumsfaktor gebildet werden und der Defekt heilt nicht. Nach zwölf Wochen ($n=7$) hingegen zeigt sich bei allen Femora der Ad.BMP-6-Gruppe die

Neubildung von Knochen, wobei mehr als 70% der Defekte überbrückt sind. Diese weisen bei Betrachtung der Sagittalschnitte noch den im Umbau befindlichen Knochenaufbau aus Spongiosa umgeben von Kortikalis innerhalb des Defekts auf. Warum nicht alle Knochen überbrückt werden können, ist nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die zu geringe BMP-Expression, z.B. durch eine zu geringe Menge an Ad.BMP-6. Betz et al. zeigten 2007, dass bei hoch dosiertem Ad.BMP-2 ($2,7 \times 10^9 \text{ pfu}$) 100% der kritischen Defekte in Rattenfemora überbrückt werden konnten. Bei mittleren Dosen ($2,7 \times 10^8 \text{ pfu}$) waren es hingegen nur 11% und bei geringen Dosen ($2,7 \times 10^7 \text{ pfu}$) nur 25%. [9] Bertone et al. konnten 2004 zeigen, dass die perkutane Injektion von Ad.BMP-6 die Knochenneubildung in einem ulnaren Osteotomiemodell im Kaninchen bewirkt. [4] Ebenso gelang bereits mehreren Arbeitsgruppen der Nachweis, dass die Injektion von Ad.BMP-2 kritische Defekte in Ratten- und Kaninchenfemora überbrücken kann. Dennoch erreichten beide Studien ebenfalls nicht bei allen Knochen eine Überbrückung. [3, 7] Darüber hinaus unterliegt die Einbringung von Adenoviren als Vektor in einen Organismus großen Sicherheitsbedenken, so kann der Vektor zum Beispiel eine nicht vorhersehbare Immunreaktion auslösen. [8] 2009 zeigten Betz et al. ebenfalls im Rattenmodell, dass die Heilung segmentaler Knochendefekte mit ex-vivo genmanipuliertem Muskelgewebe möglich ist. In dieser Arbeit zeigten alle sieben Knochen, welche mit Ad.BMP-2 aktiviertem Muskelgewebe behandelt wurden, nach sechs Wochen eine knöcherne Durchbauung des Defekts. [5] Des weiteren konnten Studien zeigen, dass auch Zellen aus dem Knochenmark, welche mit Ad.BMP-2 behandelt wurden, die Knochenheilung eines kritischen Defekts bewirken. Hierbei konnten durch Liebermann et al. rund 90% der Defekte überbrückt werden, bei Peterson et al. sogar 100%. [56, 73] Überdies ist es möglich, mit Stammzellen aus humanem infrapatellarem Fettgewebe, welche genetisch modifiziert wurden, sodass sie BMP-2 überexprimieren, eine ektopische Knochenbildung in Mäusen zu induzieren. [24] Peterson et al. gelang es darüber hinaus, kritische Defekte im Femur von Ratten mit mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe zu heilen, welche vorher mit Ad.BMP-2 bearbeitet wurden. Dabei konnten elf von zwölf Knochendefekten überbrückt werden. [72]

4.6.3 Knochenvolumen im Defekt

Die Messung des Knochenvolumens innerhalb der mittleren 3mm eines Defekts bestätigte die bereits vorgestellten bildlichen Ergebnisse. Die Kontrollgruppen zeigen kaum Knochenvolumen in besagtem Bereich, allerdings ist der Wert auch niemals Null (sechs Wochen: $0,49 \pm 0,84 \text{ mm}^3$; bzw. zwölf Wochen: $1,14 \pm 1,88 \text{ mm}^3$). Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich vermutlich nach dem Fräßen Knochensplitter in der zu untersuchenden Zone befinden, welche auch durch sorgfältiges Spülen nicht entfernt werden können. So

lässt sich auch die große Streuung der Werte, insbesondere innerhalb der Gruppe der unbehandelten Defekte erklären ($2,65 \pm 6,93 \text{mm}^3$). Die Ergebnisse der Versuchstiere, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert und sechs Wochen beobachtet wurden, liegen im Bereich der Werte der Kontrollen ($0,35 \pm 0,75 \text{mm}^3$). Dies stimmt mit den im vorangegangenen Kapitel 4.6.2 vorgestellten Bildern überein. Denkbar ist, dass erst nach dieser Zeit der Stimulus groß genug ist und Knochen gebildet wird. Eine weitere Erklärung ist, dass nach der Transduktion keine ausreichende Menge genetischer Information für BMP-6 in den Fettzellen zur Verfügung stand.

Nach zwölf Wochen sind die Werte mit $31,05 \pm 15,49 \text{mm}^3$ signifikant höher als in den zuvor erwähnten Gruppen. Nach dieser Zeit wurde genug Knochen neu gebildet, um den Defekt in rund 72% der Fälle zu überbrücken, wodurch auch am meisten Knochenvolumen innerhalb des Messbereichs vorliegt. Auch in der Literatur werden ähnliche Versuche beschrieben, welche ebenfalls erfolgreich die Knochenbildung induzieren konnten. So zeigten Betz et al., dass mit Ad.BMP-2 behandelte Muskel- und Fettzellen nach acht Wochen die Überbrückung eines kritischen Knochendefekts am Femur der Ratte erreicht werden konnte. Dabei lag das im MicroCT gemessene Knochenvolumen in der Gruppe der mit Ad.BMP-2 behandelten Muskelzellen mit $25,78 \pm 10,38 \text{mm}^3$ signifikant höher als bei den unbehandelten Defekten mit $0,49 \pm 0,65 \text{mm}^3$. Die Versuchsgruppe, welche mit Ad.BMP-2 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurde, wies im MicroCT Werte in Höhe von $25,45 \pm 2,66 \text{mm}^3$ auf, wohingegen die Gruppe der unbehandelten Defekte in dieser Studie bei Werten von $0,12 \pm 0,08 \text{mm}^3$ lag. [5, 6] Mit Hilfe BMP-4 genmanipulierter Stammzellen aus Muskelgewebe war es Shen et al. möglich kritische Defekte im Rattenfemur zur Genesung zu bringen. Hierbei wurde die Knochendichte röntgenologisch gemessen, wobei elf von zwölf kritischen Defekten nach Ausheilung $104,5 \pm 22,9\%$ der Knochendichte von gesunden Knochen erreichten. In einem Fall blieb die Überbrückung aus. [83] 2005 gelang es darüber hinaus Fettzellen in der Kultur mit Ad.BMP-2 zu behandeln und anschließend mit Hilfe eines Kollagen-Keramik-Carriers in einen kritischen Defekt einzubringen. Auch in dieser Studie konnte die Knochenheilung induziert werden. In der Auswertung der Röntgenbilder zeigte sich im Score ein signifikant höherer Wert ($5,4 \pm 0,5$) an neugebildetem Knochen in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe, welche nur den Carrier implantiert bekam ($0,8 \pm 0,2$). [72]

4.6.4 Biomechanik

Die biomechanische Torsionstestung macht eine Quantifizierung der Qualität des neu gebildeten Knochens innerhalb der Defektzone möglich. Getestet wurden nur die fünf Femora der Versuchsgruppe, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und

zwölf Wochen beobachtet wurden. Bei den Knochen, die bereits in den bildgebenden Verfahren keine knöcherne Durchbauung der Kontinuitätsunterbrechung zeigen, ist aufgrund der biomechanischen Instabilität ein Torsionstest nicht sinnvoll. Zum Vergleich mit der Versuchsgruppe werden daher sechs unbehandelte, gesunde Knochen der Gegenseite verwendet.

Die Ergebnisse für maximale Torsion und Steifigkeit dieser Arbeit zeigen, dass zwischen den gesunden Knochen und den mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten Femora, welche einen überbrückten Defekt aufwiesen, kein statistisch signifikanter Unterschied zu erheben ist. Diese Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass nach zwölf Wochen aus einer erfolgreichen Knochenheilung mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe ein dem physiologischen Knochen ähnliches Ergebnis hervorgeht.

Bestätigt werden diese Ergebnisse durch zahlreiche Angaben in der Literatur. So wurde bereits deutlich, dass eine bilaterale Osteotomie der Ulna im Kaninchenmodell, wo zur Heilung perkutan Ad.BMP-6 injiziert wurde, im Anschluss an die Behandlung im Torsionstest stabiler ist als die unbehandelte Gegenseite. [4] Auch Shen et al. zeigten, dass die maximale Torsion bis zum Bruch eines Rattenfemurs, welches zuvor mit Ad.BMP-4 behandelten Muskelstammzellen therapiert wurde, keinen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Gegenseite aufweist. [83] Ähnliche Resultate wurden in einer Studie vorgelegt, welche die Stabilität von Rattenfemora nach Behandlung mit Ad.BMP-2 aktiviertem Muskel- und Fettgewebe untersuchte. Hierbei zeigte sich, dass die geheilten Knochen fast genauso stabil bzw. stabiler waren als die gesunden Knochen der Gegenseite. [5, 6]

4.6.5 Histologie

Die histologische Auswertung zeigt die Durchbauung der Defektzone nach zwölf Wochen bei den Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurden. In der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung zeigt sich in allen Fällen eine knöcherne Überbrückung des Defekts. Der verbleibende Spalt, welcher nach außen hin von Knochen umschlossen ist, beträgt nur noch wenige Micrometer und wird von Bindegewebe mit rot-orangen Knorpel eingelagert ausgefüllt, welche in diesem Fall als Indikator für die enchondrale Ossifikation zu werten sind. Des Weiteren wird auch hier deutlich, dass nach zwölf Wochen das Remodelling mit Wiederherstellung der physiologischen Knochenarchitektur in vollem Gange ist. Die Kontrollen weisen innerhalb der Defektzone große Mengen an Fettgewebe auf. Durch die fehlende Knorpelbildung im Defekt ist auch eine Knochenheilung durch enchondrale Ossifikation nicht möglich.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Studie, bei der zur Therapie eines kritischen De-

fekts in der Ulna des Kaninchens perkutan Ad.BMP-6 injiziert worden war. Auch hier zeigte sich in allen Präparaten nach sechs bzw. acht Wochen eine knöcherne Überbrückung des Defekts. [4] Außerdem veranschaulicht eine Arbeit, welche die Knochenbruchheilung unter einer Behandlung mit Muskelzellen untersuchte, die zu Beginn mit Ad.BMP-4 behandelt wurden, in den HE-gefärbten Präparaten, dass bereits zwei Wochen nach der Operation mineralisierter Knorpel innerhalb der Defektzone vorlag. Nach zwölf Wochen zeigt sich der Markraum gefüllt von normalen Knochenmarkzellen und umhüllt von einer physiologisch anmutenden Kortikalis. [83] Auch wurde bereits die Knochenheilung nach Behandlung mit Ad.BMP-2 aktiviertem Fett- und Muskelgewebe histologisch untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass nach sechs Wochen der Defekt überbrückt war. Nach drei Wochen lag in der Defektzone der Knochen der Versuchsgruppe in der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung, neben orange-rottem Knorpel und Bindegewebe, bereits eine große Menge trabekulären Knochens vor. [5, 6]

4.7 Ausblick

Der Bedarf an Knochenersatzmaterialien ist immens, allein in den USA werden jährlich etwa 250.000 Knochentransplantationen durchgeführt, was Knochen, nach Blutbestandteilen, zum zweithäufigsten transplantierten Gewebe macht. [97]

Den Goldstandard bei der Behandlung von Knochendefekten stellt weiterhin die autologe Spongiosatransplantation dar. Aufgrund der limitierten Menge und des zusätzlichen operativen Eingriffs hat diese Methode aber viele Nachteile. Daher liegt der Schwerpunkt intensiver Forschungsarbeiten seit Jahren auf der Entwicklung eines osteoinduktiven und -konduktiven Ersatzmaterials. Seit einiger Zeit sind rhBMP-2 und rhBMP-7 unter strenger Indikationsstellung zur osteoinduktiven Therapie von Pseudarthrosen zugelassen. Angesichts der beschriebenen Probleme und Nebenwirkungen im klinischen Einsatz dieser Medikamente ist es allerdings notwendig die Anwendung zu optimieren. Dabei erlangt die Gentherapie im Tissue-Engineering immer mehr an Bedeutung. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass durch genetisch veränderte körpereigene Zellen Wachstumsfaktoren gebildet werden, welche einen Defekt kritischer Größe im Tiermodell heilen. [4, 5, 6, 83] Dabei entstehen im Rahmen des ex-vivo Gentransfers allerdings hohe Kosten, insbesondere durch aufwendige Zellkultivierungsverfahren. Außerdem bedingt diese Methode einen zweizeitigen Eingriff am Patienten: Zunächst die Entnahme des autologen Gewebes und im Anschluss daran die Reimplantation des genetisch veränderten Materials. Der in-vivo Gentransfer stellt eine schnelle und vergleichsweise kostengünstige Alternative hierzu dar. Allerdings wurde bisher noch kein Vektor gefunden, der eine ausreichend hohe Zellspezifität und Patientensicherheit aufweist. [8] Durch vereinfachten ex-vivo Gentransfer ist es nicht nötig den Vektor in den Organismus einzubringen, da durch Transduktion von Zellen im Labor allein die genetische Information in den Körper des Patienten gelangt. So wird nicht nur die Sicherheit für den Patienten erhöht, sondern auch eine kostenintensive lange Kultivierung der Zellen im Labor vermieden. Des Weiteren hat die Methode durchaus das Potenzial innerhalb einer einzigen Operation angewandt zu werden.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt im Rahmen des Prozesses „von der Werkbank ans Patientenbett“ stellt die Kosteneffektivität dar. In der Literatur liegen einige Arbeiten vor, welche zeigen konnten, dass die Behandlung mit Wachstumsfaktoren nicht teurer ist als die autologe Spongiosatransplantation. [18, 47] Durch Vereinfachung der Verfahren würden diese Kosten sogar noch gesenkt, wodurch nicht nur dem Patienten, sondern auch dem Gesundheitswesen ein großer Vorteil entstünde.

Gentherapie kann die Lösung für einen wachsenden Bedarf an Knochenersatzmaterialien sein. Nun, da die Wirksamkeit der Gentherapie zur Knochenheilung in zahlreichen Studien nachgewiesen ist, steht die Übertragung der wissenschaftlichen Erkenntnisse in den klinischen Alltag im Vordergrund.

5 Zusammenfassung

Ausgedehnte Knochendefekte stellen nach wie vor ein unzureichend gelöstes Problem in der Klinik dar. Der Standard in der Behandlung solcher Fälle ist die autologe Knochen-
transplantation. Da diese aber mit vielen Nachteilen gespickt ist, wird kontinuierlich nach alternativen Therapieoptionen gesucht. Gentechnologische Verfahren ermöglichen bereits die Herstellung rekombinanter humaner Wachstumsfaktoren, doch gibt es auch in deren Anwendung nach wie vor einige Probleme, die es zu lösen gilt. Die in der Klinik zugelassenen Medikamente sind rhBMP-2 und rhBMP-7. Allerdings ist die Indikation für deren Einsatz aufgrund behördlicher Beschränkungen sehr streng zu stellen. Überdies kommt es nach der Anwendung solcher osteoinduktiver Substanzen, welche meist auf einen Carrier aufgebracht in den Defekt implantiert werden, nicht selten zu heterotopen Ossifikationen, was zu erheblichen sekundären Beschwerden führen kann.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung eines vereinfachten Gentransfers, wodurch die implantierten Zellen im knöchernen Defekt BMP-6 produzierten und so die Heilung vorantrieben.

Hierzu wurden insgesamt 53 Fischer 344 Ratten mit einem 5mm großen, gefräßten Defekt am rechten Femur versehen, der durch einen internen Fixateur stabilisiert wurde. Der Defekt wurde dann je nach Gruppenzugehörigkeit behandelt: Die Gruppe der unbehandelten Defekte, bestehend aus 11 Tieren, erhielt keine weitergehende Therapie, bei weiteren 22 Tieren wurde der Defekt mit nicht modifiziertem Fettgewebe eines Spendertieres ausgefüllt und bei 20 Ratten wurde der Defekt mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe versorgt. Die Hälfte der Tiere innerhalb einer Gruppe wurde sechs Wochen, die andere Hälfte zwölf Wochen beobachtet. Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels MicroCT, biomechanischem Torsionstest und Histologie, wobei als Hauptzielgröße die mechanische Stabilität anzusehen war. Des Weiteren wurden mit Ad.BMP-6 transduzierte Fettgewebstückchen *in vitro* kultiviert, um mit Hilfe eines ELISAs nachzuweisen, dass von den Zellen der gewünschte Wachstumsfaktor produziert wurde.

Hierbei bestätigte sich, dass die mit Ad.BMP-6 transduzierten Fettzellen BMP-6 produzierten. In den computertomographischen Bildern zeigte sich nach zwölf Wochen bei fünf von sieben der Präparate eine knöcherne Durchbauung der Defektzone. Wobei der Knochen makroskopisch von intaktem Knochen nicht zu unterscheiden war. Im Sagittalschnitt dieser Präparate waren neben einer sehr dicken Kortikalis noch ansatzweise spongiöse Knochenbälkchen zu sehen. In den anderen Versuchsgruppen konnte keine Überbrückung der knöchernen Defekte erreicht werden. Möglicherweise war bei der Transduktion der Fettgewebstückchen für die Gruppe der Tiere, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurde, nicht ausreichend cDNA in die Zielzellen

übertragen worden, wodurch nicht genügend BMP-6 gebildet wurde und der Defekt offen blieb. Zusätzlich wurde mit Hilfe des MicroCTs das Knochenvolumen in den mittleren 3mm des Defekts, also 1,5mm ober- und unterhalb der Defektmitte, bestimmt. Die Ergebnisse verhielten sich hierbei den MicroCT-Bildern entsprechend, wobei das Knochenvolumen in der Versuchsgruppe, welche mit genetisch verändertem Fettgewebe therapiert und zwölf Wochen beobachtet wurde, im Mittel mit rund 31mm^3 signifikant höher war als in allen anderen Gruppen. In die biomechanische Testung wurden nur die fünf durchbauten Femora sowie sechs gesunde kontralaterale Knochen eingeschlossen. Dabei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Dennoch verdeutlicht dieses Ergebnis, dass das angewendete experimentelle Therapieverfahren nach zwölf Wochen in Sachen Stabilität dem natürlichen Knochen fast ebenbüdig ist. Histologisch bestätigten sich in der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung die computertomographischen Ergebnisse. Bei den Präparaten, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden, war innerhalb der Defektzone eine Durchbauung mit Knochen sichtbar, wobei auch noch Reste von Knorpel und fibrösem Bindegewebe vorlagen. Auf den Bildern der anderen Versuchsgruppen zeigte sich der Defekt ausgefüllt durch Fett, Muskel oder Bindegewebe, es war weder Knorpel noch Knochen zu erkennen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der vereinfachte ex-vivo Gentransfer von BMP-6 auf Fettgewebe eine sinnvolle Option zur Regeneration von Knochendefekten darstellt. Zum einen fand der Gentransfer nicht im Patienten, sondern im Labor statt, wodurch kein Patient-Vektor-Kontakt entstand und daraus resultierende Sicherheitsbedenken minimiert werden konnten. Außerdem liegt das hier verwendete autologe Fettgewebe, auch beim Menschen, in großen Mengen vor und kann in einem unkomplizierten kleinen Eingriff entnommen werden. Überdies war der durch dieses Verfahren gebildete Knochen im Rattenmodell hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften dem gesunden Material ebenbüdig. Diese Studie zeigte, dass in der Ratte große segmentale Knochendefekte mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe geheilt werden konnten.

Literatur

- [1] ALDEN, T. D. ; VARADY, P. ; KALLMES, D. F. ; JANE, Jr. J. A. J. A. ; HELM, G. A.: Bone morphogenetic protein gene therapy. In: *Spine* 27 (2002), Nr. 16 Suppl 1, S. S87–93
- [2] ARRINGTON, E. D. ; SMITH, W. J. ; CHAMBERS, H. G. ; BUCKNELL, A. L. ; DAVINO, N. A.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. In: *Clin Orthop Relat Res* (1996), Nr. 329, S. 300–9
- [3] BALTZER, A. W. ; LATTERMANN, C. ; WHALEN, J. D. ; WOOLEY, P. ; WEISS, K. ; GRIMM, M. ; GHIVIZZANI, S. C. ; ROBBINS, P. D. ; EVANS, C. H.: Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. In: *Gene Ther* 7 (2000), Nr. 9, S. 734–9
- [4] BERTONE, A. L. ; PITTMAN, D. D. ; BOUXSEIN, M. L. ; LI, J. ; CLANCY, B. ; SEEHERMAN, H. J.: Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. In: *J Orthop Res* 22 (2004), Nr. 6, S. 1261–70
- [5] BETZ, O. B. ; BETZ, V. M. ; ABDULAZIM, A. ; PENZKOFER, R. ; SCHMITT, B. ; SCHRODER, C. ; AUGAT, P. ; JANSSON, V. ; MULLER, P. E.: Healing of large segmental bone defects induced by expedited bone morphogenetic protein-2 gene-activated, syngeneic muscle grafts. In: *Hum Gene Ther* 20 (2009), Nr. 12, S. 1589–96
- [6] BETZ, O. B. ; BETZ, V. M. ; ABDULAZIM, A. ; PENZKOFER, R. ; SCHMITT, B. ; SCHRODER, C. ; MAYER-WAGNER, S. ; AUGAT, P. ; JANSSON, V. ; MULLER, P. E.: The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants. In: *Tissue Eng Part A* 16 (2010), Nr. 3, S. 1093–101
- [7] BETZ, Oliver B. ; BETZ, Volker M. ; NAZARIAN, Ara ; PILAPIL, Carmencita G. ; VRAHAS, Mark S. ; BOUXSEIN, Mary L. ; GERSTENFELD, Louis C. ; EINHORN, Thomas A. ; EVANS, Christopher H.: Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. In: *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006), Feb, Nr. 2, S. 355–365
- [8] BETZ, V. M. ; BETZ, O. B. ; HARRIS, M. B. ; VRAHAS, M. S. ; EVANS, C. H.: Bone tissue engineering and repair by gene therapy. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13 (2008), S. 833–41
- [9] BETZ, Volker M. ; BETZ, Oliver B. ; GLATT, Vaida ; GERSTENFELD, Louis C. ; EINHORN, Thomas A. ; BOUXSEIN, Mary L. ; VRAHAS, Mark S. ; EVANS, Christopher H.: Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery:

- effect of vector dose. In: *Hum Gene Ther* 18 (2007), Oct, Nr. 10, S. 907–915
- [10] BODEN, Scott D.: The ABCs of BMPs. In: *Orthop Nurs* 24 (2005), Nr. 1, S. 49–52; quiz 53–4
- [11] BONNARENS, F. ; EINHORN, T. A.: Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. In: *J Orthop Res* 2 (1984), Nr. 1, S. 97–101
- [12] BORRELLI, Joseph ; PAPE, Chris ; HAK, David ; HSU, Joseph ; LIN, Sheldon ; GIANNOUDIS, Peter ; LANE, Joseph: Physiological challenges of bone repair. In: *J Orthop Trauma* 26 (2012), Dec, Nr. 12, S. 708–711
- [13] BOSCH, C. ; MELSEN, B. ; VARGERVIK, K.: Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. In: *J Craniofac Surg* 9 (1998), Jul, Nr. 4, S. 310–316
- [14] BÖRM, W. ; MEYER, F.: *Spinale Neurochirurgie: Operatives Management von Wirbelsäulenerkrankungen*. Bd. 1. Auflage. 2008
- [15] CAO, H. ; KOEHLER, D. R. ; HU, J.: Adenoviral vectors for gene replacement therapy. In: *Viral Immunol* 17 (2004), Nr. 3, S. 327–33
- [16] CHEN, D. ; ZHAO, M. ; MUNDY, G. R.: Bone morphogenetic proteins. In: *Growth Factors* 22 (2004), Nr. 4, S. 233–41
- [17] CUI, Fuai ; WANG, Xiuli ; LIU, Xianxi ; DIGHE, Abhijit S. ; BALIAN, Gary ; CUI, Quanjun: VEGF and BMP-6 enhance bone formation mediated by cloned mouse osteoprogenitor cells. In: *Growth Factors* 28 (2010), Oct, Nr. 5, S. 306–317
- [18] DAHABREH, Z. ; CALORI, G. M. ; KANAKARIS, N. K. ; NIKOLAOU, V. S. ; GIANNOUDIS, P. V.: A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. In: *International orthopaedics* 33 (2009), Nr. 5, S. 1407–14
- [19] DAHABREH, Z. ; DIMITRIOU, R. ; GIANNOUDIS, P. V.: Health economics: a cost analysis of treatment of persistent fracture non-unions using bone morphogenetic protein-7. In: *Injury* 38 (2007), Nr. 3, S. 371–7
- [20] DE UGARTE, D. A. ; MORIZONO, K. ; ELBARBARY, A. ; ALFONSO, Z. ; ZUK, P. A. ; ZHU, M. ; DRAGOO, J. L. ; ASHJIAN, P. ; THOMAS, B. ; BENHAIM, P. ; CHEN, I. ; FRASER, J. ; HEDRICK, M. H.: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. In: *Cells Tissues Organs* 174 (2003), Nr. 3, S. 101–9
- [21] DIMITRIOU, R. ; GIANNOUDIS, P. V.: Discovery and development of BMPs. In: *Injury* 36 Suppl 3 (2005), S. S28–33

-
- [22] DIMITRIOU, Rozalia ; JONES, Elena ; MCGONAGLE, Dennis ; GIANNOUDIS, Peter V.: Bone regeneration: current concepts and future directions. In: *BMC Med* 9 (2011), S. 66
- [23] DINOPOULOS, H. ; GIANNOUDIS, P. V.: The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. In: *Current Orthopaedics* 21 (2007)
- [24] DRAGOO, J. L. ; SAMIMI, B. ; ZHU, M. ; HAME, S. L. ; THOMAS, B. J. ; LIEBERMAN, J. R. ; HEDRICK, M. H. ; BENHAIM, P.: Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. In: *J Bone Joint Surg Br* 85 (2003), Nr. 5, S. 740–7
- [25] DRAGOO, Jason L. ; CHOI, Joon Y. ; LIEBERMAN, Jay R. ; HUANG, Jerry ; ZUK, Patricia A. ; ZHANG, Jeffery ; HEDRICK, Marc H. ; BENHAIM, Prosper: Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. In: *J Orthop Res* 21 (2003), Jul, Nr. 4, S. 622–629
- [26] DROSSE, Inga ; VOLKMER, Elias ; SEITZ, Sebastian ; SEITZ, Hermann ; PENZKOFER, Rainer ; ZAHN, Klaus ; MATIS, Ulrike ; MUTSCHLER, Wolf ; AUGAT, Peter ; SCHIEKER, Matthias: Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. In: *Tissue Eng Part C Methods* 14 (2008), Mar, Nr. 1, S. 79–88
- [27] EBISAWA, T. ; TADA, K. ; KITAJIMA, I. ; TOJO, K. ; SAMPATH, T. K. ; KAWABATA, M. ; MIYAZONO, K. ; IMAMURA, T.: Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. In: *J Cell Sci* 112 (Pt 20) (1999), S. 3519–27
- [28] EUROPEAN MEDICINES AGENCY, EMA: *Produktinformation InductOs*. 08 2008
- [29] EUROPEAN MEDICINES AGENCY, EMA: *Produktinformation Osigraft*. 04 2008
- [30] EUROPEAN MEDICINES AGENCY, EMA: *Produktinformation Opgenra*. 03 2009
- [31] EVANS, C. H. ; LIU, F. J. ; GLATT, V. ; HOYLAND, J. A. ; KIRKER-HEAD, C. ; WALSH, A. ; BETZ, O. ; WELLS, J. W. ; BETZ, V. ; PORTER, R. M. ; SAAD, F. A. ; GERSTENFELD, L. C. ; EINHORN, T. A. ; HARRIS, M. B. ; VRAHAS, M. S.: Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. In: *European cells & materials* 18 (2009), S. 96–111
- [32] EVANS, Christopher H. ; GHIVIZZANI, Steven C. ; ROBBINS, Paul D.: The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. In: *Clin Orthop Relat Res* (2004), Dec, Nr. 429, S. 316–329
- [33] EWERBECK, V. ; WENTZENSEN, A ; HOLZ, F. ; KRÄMER, K. L. ; PFEIL, J. ;

- SABO, D.: *Standardverfahren in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie*. Bd. 2. Auflage. 2006
- [34] FRASER, John K. ; WULUR, Isabella ; ALFONSO, Zeni ; HEDRICK, Marc H.: Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. In: *Trends Biotechnol* 24 (2006), Apr, Nr. 4, S. 150–154
- [35] FRIEDLAENDER, G. E. ; PERRY, C. R. ; COLE, J. D. ; COOK, S. D. ; CIERNY, G. ; MUSCHLER, G. F. ; ZYCH, G. A. ; CALHOUN, J. H. ; LAFORTE, A. J. ; YIN, S.: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. In: *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001), Nr. Pt 2, S. S151–S158
- [36] FU, Rongwei ; SELPH, Shelley ; MCDONAGH, Marian ; PETERSON, Kimberly ; TIWARI, Arpita ; CHOU, Roger ; HELFAND, Mark: Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. In: *Ann Intern Med* 158 (2013), Jun, Nr. 12, S. 890–902
- [37] GITELMAN, S. E. ; KIRK, M. ; YE, J. Q. ; FILVAROFF, E. H. ; KAHN, A. J. ; DERYNCK, R.: Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 6 (1995), Nr. 7, S. 827–36
- [38] HADJI: Epidemiologie der Osteoporose: Bone Evaluation Study. In: *Deutsches Ärzteblatt* 110(4) (2013), S. 52–7
- [39] HANDELS: *Medizinische Bildverarbeitung*. 2009
- [40] HARLANLABORATORIES: Growth Chart of Sprague Dawley Rats. (2008)
- [41] HARLANLABORATORIES: Growth Chart of Fischer 344 Rats. (2009)
- [42] HELDER, M. N. ; KNIPPENBERG, M. ; KLEIN-NULEND, J. ; WUISMAN, P. I.: Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. In: *Tissue engineering* 13 (2007), Nr. 8, S. 1799–808
- [43] HELLRIEGEL, T: *BMP-2 in der Therapie der Pseudarthrose langer Röhrenknochen - erste klinische Anwendungen*, FU Berlin, Diss., 2010
- [44] HENNE-BRUNS, D. ; DÜRIG, M. ; KREMER, B. ; BOB, A. ; BOB, K.: *Duale Reihe Chirurgie*. 2007
- [45] HORNER, Elizabeth A. ; KIRKHAM, Jennifer ; WOOD, David ; CURRAN, Stephen ; SMITH, Mark ; THOMSON, Brian ; YANG, Xuebin B.: Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. In: *Tissue Eng Part B Rev* 16 (2010), Apr, Nr. 2, S. 263–271
- [46] ICKS: Inzidenz von Hüftfrakturen in Deutschland – Auswertung der Krankenhaus-

- diagnosestatistik 2004. In: *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 133(4): (2008), S. 125–128
- [47] JONES, Alan L.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in fracture care. In: *J Orthop Trauma* 19 (2005), Nr. 10 Suppl, S. S23–S25
- [48] KANAKARIS, N. K. ; GIANNOUDIS, P. V.: The health economics of the treatment of long-bone non-unions. In: *Injury* 38 Suppl 2 (2007), S. S77–84
- [49] KANG, Q. ; SUN, M. H. ; CHENG, H. ; PENG, Y. ; MONTAG, A. G. ; DEYRUP, A. T. ; JIANG, W. ; LUU, H. H. ; LUO, J. ; SZATKOWSKI, J. P. ; VANICHAKARN, P. ; PARK, J. Y. ; LI, Y. ; HAYDON, R. C. ; HE, T. C.: Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. In: *Gene Ther* 11 (2004), Nr. 17, S. 1312–20
- [50] KAWAI, Mariko ; BESSHO, Kazuhisa ; KAIHARA, Shinji ; SONOBE, Junya ; ODA, Kimimitsu ; IIZUKA, Tadahiko ; MARUYAMA, Hiroki: Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. In: *Hum Gene Ther* 14 (2003), Nov, Nr. 16, S. 1547–1556
- [51] KRÖGER: Epidemiologie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit in Deutschland. In: *Hämostaseologie* Vol. 26: Issue 3 (2006), S. 193–196
- [52] KUGIMIYA, F. ; OHBA, S. ; NAKAMURA, K. ; KAWAGUCHI, H. ; CHUNG, U. I.: Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. In: *J Bone Miner Metab* 24 (2006), Nr. 2, S. 95–9
- [53] LANG: *Histotechnik*. 2013
- [54] LAURENT, Jeffrey J. ; WEBB, K. M. ; BERES, Elisa J. ; MCGEE, Kevin ; LI, Jinzhong ; RIETBERGEN, Bert van ; HELM, Gregory A.: The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbits. In: *J Neurosurg Spine* 1 (2004), Jul, Nr. 1, S. 90–94
- [55] LEE, Joon Y. ; PENG, Hairong ; USAS, Arvydas ; MUSGRAVE, Douglas ; CUMMINS, James ; PELINKOVIC, Dalip ; JANKOWSKI, Ron ; ZIRAN, Bruce ; ROBBINS, Paul ; HUARD, Johnny: Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. In: *Hum Gene Ther* 13 (2002), Jul, Nr. 10, S. 1201–1211
- [56] LIEBERMAN, J. R. ; DALUISKI, A. ; STEVENSON, S. ; WU, L. ; MCALLISTER, P. ; LEE, Y. P. ; KABO, J. M. ; FINERMAN, G. A. ; BERK, A. J. ; WITTE, O. N.: The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. In: *J Bone Joint Surg Am* 81 (1999), Nr. 7, S. 905–17

- [57] LIEBERMAN, J. R. ; GHIVIZZANI, S. C. ; EVANS, C. H.: Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. In: *Mol Ther* 6 (2002), Nr. 2, S. 141–7
- [58] LUU, H. H. ; SONG, W. X. ; LUO, X. ; MANNING, D. ; LUO, J. ; DENG, Z. L. ; SHARFF, K. A. ; MONTAG, A. G. ; HAYDON, R. C. ; HE, T. C.: Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In: *J Orthop Res* 25 (2007), Nr. 5, S. 665–77
- [59] LYNCH, Joseph R. ; TAITSMAN, Lisa A. ; BAREI, David P. ; NORK, Sean E.: Femoral nonunion: risk factors and treatment options. In: *J Am Acad Orthop Surg* 16 (2008), Feb, Nr. 2, S. 88–97
- [60] MARIE, Pierre J. ; FROMIGUÉ, Olivia: Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Regen Med* 1 (2006), Jul, Nr. 4, S. 539–548
- [61] MARKART: *Erprobung resorbierbarer Implantate zur Knorpelregeneration am Kniegelenk – eine tierexperimentelle Studie am Schaf*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2013
- [62] MCCULLOUGH, K. A. ; WAITS, C. A. ; GARIMELLA, R. ; TAGUE, S. E. ; SIPE, J. B. ; ANDERSON, H. C.: Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation. In: *J Orthop Res* 25 (2007), Nr. 4, S. 465–72
- [63] Kapitel 5.2, 5.4. In: MCKEE, M. D.: *Ao-Prinzipien des Frakturmanagement*. Bd. 1. Rüedi, T. P. Buckley, R. E. Moran, C. G., S. 505 – 519, 543 – 555
- [64] MCRAE, R. ; ESSER, M.: *Praxis der Frakturbehandlung*. Bd. 4. Auflage. 2009. – 94 – 96 S.
- [65] MEINERS, J. ; GERLACH, U. ; MAGERLEIN, S. ; JURGENS, C. ; FASCHINGBAUER, M.: Pseudoarthroses. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen* 80 (2009), Nr. 10, S. 979–86
- [66] MEYERROSE, Todd ; OLSON, Scott ; PONTOW, Suzanne ; KALOMOIRIS, Stefanos ; JUNG, Yunjoon ; ANNETT, GERALYN ; BAUER, Gerhard ; NOLTA, Jan A.: Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. In: *Adv Drug Deliv Rev* 62 (2010), Sep, Nr. 12, S. 1167–1174
- [67] MILLER, Daniel G. ; WANG, Pei-Rong ; PETEK, Lisa M. ; HIRATA, Roli K. ; SANDS, Mark S. ; RUSSELL, David W.: Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. In: *Nat Biotechnol* 24 (2006), Aug, Nr. 8, S. 1022–1026
- [68] MIZUNO, Hiroshi: Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. In: *J Nippon Med Sch* 76 (2009), Apr, Nr.

- 2, S. 56–66
- [69] NIETHARD, F. U. ; PFEIL, J. ; BIBERTHALER, P.: *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. Bd. 6. Auflage. 2009
- [70] OLIGINO, T. J. ; YAO, Q. ; GHIVIZZANI, S. C. ; ROBBINS, P.: Vector systems for gene transfer to joints. In: *Clin Orthop Relat Res* (2000), Nr. 379 Suppl, S. S17–30
- [71] In: PETERS, K. M. ; KÖNIG, D. P.: *Fortbildung Osteologie*. Bd. 3, S. 78 – 93, 97 – 115
- [72] PETERSON, B. ; ZHANG, J. ; IGLESIAS, R. ; KABO, M. ; HEDRICK, M. ; BENHAIM, P. ; LIEBERMAN, J. R.: Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. In: *Tissue Eng* 11 (2005), Nr. 1-2, S. 120–9. – Peterson, Brett Zhang, Jeffrey Iglesias, Roberto Kabo, Michael Hedrick, Marc Benhaim, Prosper Lieberman, Jay R R01 AR46789/AR/NIAMS NIH HHS/United States Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. United States Tissue engineering *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):120-9.
- [73] PETERSON, Brett ; IGLESIAS, Roberto ; ZHANG, Jeffrey ; WANG, Jeffrey C. ; LIEBERMAN, Jay R.: Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting. In: *Spine (Phila Pa 1976)* 30 (2005), Feb, Nr. 3, S. 283–9; discussion 289–90
- [74] PFIZER: *Gebrauchsinformation - InductOs 12mg Kit zur Implantation*. 2010
- [75] RASSOW, J. ; HAUSER, K. ; NETZKER, R. ; DEUTZMANN, R.: *Duale Reihe Biochemie*. Bd. 2. Auflage. 2008
- [76] RATHMANN: Typ-2-Diabetes: Prävalenz und Relevanz angeborener und erworbener Faktoren für die Prädiktion. In: *Deutsches Ärzteblatt* 110(19):331–7 (2013)
- [77] REDDI, A. H.: Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. In: *J Cell Biochem* 56 (1994), Oct, Nr. 2, S. 192–195
- [78] REDDI, A. H.: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. In: *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001), Nr. Pt 1, S. S1–S6
- [79] REGAUER, M. ; JÜRGENS, I. ; KOTSIANOS, D. ; STÜTZLE, H. ; MUTSCHLER, W. ; SCHIEKER, M.: [New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep]. In: *Zentralbl Chir* 130 (2005), Aug, Nr. 4, S. 338–345
- [80] ROSENBAUM, Andrew ; UHL, Richard: Nonunion of humeral shaft fractures following

- flexible nailing fixation. In: *Orthopedics* 35 (2012), Jun, Nr. 6, S. 512–515
- [81] ROSENBERG: Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. In: *J Bone Joint Surg Am.* 53(1) (1971), S. 69–82
- [82] SCHOELLNER: High energy extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in pseudarthrosis. In: *Orthopäde* 31(7) (2002), S. 658–62
- [83] SHEN, H. C. ; PENG, H. ; USAS, A. ; GEARHART, B. ; FU, F. H. ; HUARD, J.: Structural and functional healing of critical-size segmental bone defects by transduced muscle-derived cells expressing BMP4. In: *J Gene Med* 6 (2004), Nr. 9, S. 984–91
- [84] SHEYN, Dmitriy ; KALLAI, Ilan ; TAWACKOLI, Wafa ; YAKUBOVICH, Doron C. ; OH, Anthony ; SU, Susan ; DA, Xiaoyu ; LAVI, Amir ; KIMELMAN-BLEICH, Nadav ; ZILBERMAN, Yoram ; LI, Ning ; BAE, Hyun ; GAZIT, Zulma ; PELLED, Gadi ; GAZIT, Dan: Gene-modified adult stem cells regenerate vertebral bone defect in a rat model. In: *Mol Pharm* 8 (2011), Oct, Nr. 5, S. 1592–1601
- [85] SHIMASAKI, S. ; MOORE, R. K. ; OTSUKA, F. ; ERICKSON, G. F.: The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. In: *Endocrine reviews* 25 (2004), Nr. 1, S. 72–101
- [86] SIMMONDS, Mark C. ; BROWN, Jennifer V E. ; HEIRS, Morag K. ; HIGGINS, Julian P T. ; MANNION, Richard J. ; RODGERS, Mark A. ; STEWART, Lesley A.: Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data. In: *Ann Intern Med* 158 (2013), Jun, Nr. 12, S. 877–889
- [87] SIRION: *Vektorinformation*
- [88] SIRION: *Vektorinformation Sirion Ad5*
- [89] SPECKMANN, E. J. ; HESCHELER, J. ; KÖHLING, R.: *Physiologie*. Bd. 5. Auflage. 2008
- [90] STEINMANN, J. C. ; HERKOWITZ, H. N.: Pseudarthrosis of the spine. In: *Clin Orthop Relat Res* (1992), Nov, Nr. 284, S. 80–90
- [91] STREET, John ; BAO, Min ; DEGUZMAN, Leo ; BUNTING, Stuart ; PEALE, Franklin V. ; FERRARA, Napoleone ; STEINMETZ, Hope ; HOFFEL, John ; CLELAND, Jeffrey L. ; DAUGHERTY, Ann ; BRUGGEN, Nicholas van ; REDMOND, H. P. ; CARRANO, Richard A D. ; FILVAROFF, Ellen H.: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Jul, Nr. 15, S. 9656–9661

- [92] STREM, Brian M. ; HICOK, Kevin C. ; ZHU, Min ; WULUR, Isabella ; ALFONSO, Zeni ; SCHREIBER, Ronda E. ; FRASER, John K. ; HEDRICK, Marc H.: Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. In: *Keio J Med* 54 (2005), Sep, Nr. 3, S. 132–141
- [93] STRYKER: *Gebrauchsanweisung Osigraft 3,5mg*
- [94] SUGIYAMA, Osamu ; AN, Dong S. ; KUNG, Sam P K. ; FEELEY, Brian T. ; GAMRADT, Seth ; LIU, Nancy Q. ; CHEN, Irvin S Y. ; LIEBERMAN, Jay R.: Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. In: *Mol Ther* 11 (2005), Mar, Nr. 3, S. 390–398
- [95] SWIONTKOWSKI, M. F. ; ARO, H. T. ; DONELL, S. ; ESTERHAI, J. L. ; GOULET, J. ; JONES, A. ; KREGOR, P. J. ; NORDSLETTEN, L. ; PAIEMENT, G. ; PATEL, A.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 (2006), Nr. 6, S. 1258–65
- [96] TALWAR, R. ; DI SILVIO, L. ; HUGHES, F. J. ; KING, G. N.: Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. In: *J Clin Periodontol* 28 (2001), Nr. 4, S. 340–7
- [97] TESCHNER: Gentechnisch induziertes Knochenwachstum. In: *Deutsches Ärzteblatt* 96 (1999), S. 28–29
- [98] ULUDAG, H. ; GAO, T. ; PORTER, T. J. ; FRIESS, W. ; WOZNEY, J. M.: Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. In: *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001), Nr. Pt 2, S. S128–35
- [99] UNGER, Nina: *R26-hPLAP-transgene Fischer-344-Ratten als Tiermodell für Fragestellungen zur Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen*, Tierärztliche Fakultät der LMU München, Diss., 2004
- [100] URIST, M. R.: Bone: formation by autoinduction. In: *Science* 150 (1965), Nr. 698, S. 893–9
- [101] URIST, M. R.: Origins of current ideas about calcification. In: *Clin Orthop Relat Res* 44 (1966), S. 13–39
- [102] VINKEN A, Albert J. Van Engen A A. Van Engen A: *The cost effectiveness of Osigraft 1 (osteogenic protein 1) in the treatment of tibial nonunions in the UK and Germany*. 2003
- [103] WATANABE, Yoshinobu ; HARADA, Noriko ; ABE, Satoshi ; MATSUSHITA, Takashi ; YAMANAKA, Katsuyuki ; KANEKO, Tadashi ; SAKAI, Yuhiro ; SATO, Kenji: Esta-

- blishment of reproducible critical size bone defect model in rat femur. In: *Tissue Eng Part C Methods* (2014), Apr
- [104] WEBER, B. G. ; CECH, O.: *Pseudarthrosen*
- [105] WEDEMEYER, C. ; PEPPMULLER, R. ; BREDENDIEK, T.: Therapy-resistant, atrophic and septic femoral pseudarthrosis. In: *Der Orthopade* 40 (2011), Nr. 5, S. 440–3
- [106] WESTERHUIS, R. J. ; BEZOOIJEN, R. L. ; KLOEN, P.: Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. In: *Injury* 36 (2005), Nr. 12, S. 1405–12
- [107] WINTER, T.: *Komplikationen gibt es nicht - oder doch?: Stationäre Aufenthalte in Orthopädie und Traumatologie - eine Verlaufsstudie*. Bd. 1. Auflage. 2011
- [108] WIPPERMANN, B. W. ; SCHRATT, H. E. ; STEEG, S. ; TSCHERNE, H.: [Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases]. In: *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 68 (1997), Nr. 12, S. 1286–91
- [109] WOZNEY, J. M.: Bone morphogenetic proteins. In: *Progress in growth factor research* 1 (1989), Nr. 4, S. 267–80
- [110] WOZNEY, J. M.: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. In: *Molecular reproduction and development* 32 (1992), Nr. 2, S. 160–7
- [111] WOZNEY, J. M. ; ROSEN, V.: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* (1998), Nr. 346, S. 26–37
- [112] XIAO, Y. T. ; XIANG, L. X. ; SHAO, J. Z.: Bone morphogenetic protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 362 (2007), Nr. 3, S. 550–3
- [113] YARAK, S. ; OKAMOTO, O. K.: Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. In: *Anais brasileiros de dermatologia* 85 (2010), Nr. 5, S. 647–56
- [114] YASKO, A. W. ; LANE, J. M. ; FELLINGER, E. J. ; ROSEN, V. ; WOZNEY, J. M. ; WANG, E. A.: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. In: *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992), Jun, Nr. 5, S. 659–670
- [115] ZIMMERMANN, G. ; MOGHADDAM, A. ; WAGNER, C. ; VOCK, B. ; WENTZENSEN, A.: Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones. In: *Der Unfallchirurg* 109 (2006), Nr. 7, S. 528–37
- [116] ZIMMERMANN, G. ; MULLER, U. ; LOFFLER, C. ; WENTZENSEN, A. ; MOGHADDAM,

A.: Therapeutic outcome in tibial pseudarthrosis: bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) versus autologous bone grafting for tibial fractures. In: *Der Unfallchirurg* 110 (2007), Nr. 11, S. 931–8

Abbildungsverzeichnis

1	Hypertrophe Pseudarthrose des Humerus, modifiziert nach [80]	8
2	Atrophe Pseudarthrose des Femur nach Versorgung mit einem Marknagel, modifiziert nach [59]	8
3	Schematische Darstellung der Molekülstruktur von BMP-2 [112]	13
4	Vektorkarte [87]	21
5	Fünf Wells mit transduzierten Fettgewebstückchen	23
6	3D-Bild einer Fixateurplatte mit Schrauben	27
7	implantationsbereites Fettgewebe	28
8	Ablauf der Operation Schritt 1 und 2	30
9	Ablauf der Operation Schritt 3 und 4	31
10	Ablauf der Operation Schritt 5 und 6	32
11	Ablauf der Operation Schritt 7 und 8	33
12	Versuchsaufbau biomechanische Messung	37
13	Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der unbehandelten Defekte. Kei- ner der Defekte ist knöchern überbrückt.	41
14	Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit nicht mo- difiziertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.	42
15	Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit nicht mo- difiziertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.	43
16	Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit AdBMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Keiner der Defekte ist knöchern überbrückt.	44
17	Röntgenbilder der Femora aus der Gruppe der Tiere, welche mit AdBMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Fünf der sieben femoralen Defekte wurden knöchern durchbaut. Bei zwei Defekten (E.1 und E.7) findet sich im Spalt ein Knochenfragment.	45
18	MicroCT-Bilder der unbehandelten Defekte zwölf Wochen nach der Opera- tion. In keinem der Fälle kam es zur Defektüberbrückung.	46
19	Sagitalschnitte der MicroCT-Bilder der unbehandelten Defekte zwölf Wo- chen nach der Operation. Zur knöchernen Durchbauung des Defekts kam es in keinem der Fälle.	47

20	MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Keine der CT-Rekonstruktionen zeigt eine Überbrückung des Defekts mit Knochen.	49
21	Sagitalschnitte der MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Die Defektüberbrückung blieb in allen Fällen aus.	50
22	MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen. In keinem der Fälle kam es zu einer Überbrückung des Defekts.	51
23	Längsschnitte der MicroCT-Bilder der Fettkontrollen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen. Kein Femur wurde knöchern überbrückt.	52
24	MicroCT-Bilder der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. Auf keiner der Rekonstruktionen ist eine knöcherne Überbrückung erkennbar.	54
25	Sagitalschnitte der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und sechs Wochen beobachtet wurden. In keinem Fall zeigt sich eine knöcherne Durchbauung des Defekts.	55
26	MicroCT-Bilder der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Fünf der sieben Femora (B-F) sind knöchern durchbaut, wobei an einem Femur (B) eine deutliche Kallusbildung zu sehen ist. In zwei Fällen (A und G) hat keine Überbrückung stattgefunden. Hier zeigt sich bei A ein ca. 1,0x0,6 mm großes, ovales Knochenfragment im Defektspalt, bei G ein etwa 4x2,5mm großes, ovales Knochenstück.	56
27	Sagitalschnitte der Präparate, welche mit Ad.BMP-6-aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden. Bei fünf von sieben Rekonstruktionen (B-F) zeigt sich eine knöcherne Überbrückung des Defekts. Drei Femora (D, E und F) weisen außen eine Kortikalis und im Markraum Spongiosa auf. Bei den anderen beiden Fällen (B und C) ist der Knochen im Inneren der ehemaligen Defektzone sehr kompakt.	57

-
- 28 Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den Kontrollgruppen und den mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelten Versuchsgruppen jeweils nach sechs und zwölf Wochen, welches mit Hilfe des MicroCTs bestimmt wurde. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. Gemessen wurden n=8 unbehandelte Defekte, n=14 Fettkontrollen (sechs nach sechs Wochen und acht nach zwölf Wochen Beobachtungszeit) und n=14 Ad.BMP-6 aktivierte Fetttransplantate (sieben nach sechs Wochen und sieben nach zwölf Wochen Beobachtungszeit). *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen (p=0,0078). 59
- 29 Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen der Gruppe, welche mit nicht modifiziertem Fettgewebe (n=6) behandelt wurde und der, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe (n=7) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen sechs Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Fettkontrollen (p=0.0313). 60
- 30 Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen der Gruppe, welche mit nichtmodifiziertem Fettgewebe (n=8) behandelt wurde und der, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe (n=7) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen zwölf Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate (p=0,0078). 61
- 31 Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den unbehandelten Defekten (n=8) und der Versuchsgruppe, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe (n=7) therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug bei den unbehandelten Defekten zwölf Wochen und in der anderen Gruppe sechs Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen bei den unbehandelten Defekten (p=0,0078). 62

32	Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den unbehandelten Defekten (n=8) und der Versuchsgruppe (n=7), die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Gruppen zwölf Wochen. Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch signifikant höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate (p=0,0078).	63
33	Vergleich des Knochenvolumens in der Defektmitte zwischen den Versuchsgruppen, die mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe therapiert wurde. Der Beobachtungszeitraum betrug in der einen Gruppe sechs Wochen (n=7) und in der anderen Gruppe zwölf Wochen (n=7). Die dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte +/- Standardabweichung. *statistisch höheres Knochenvolumen in der Gruppe der Ad.BMP-6 aktivierten Fetttransplantate nach zwölf Wochen (p = 0,0078).	64
34	Vergleich der maximalen Torsion der Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden (n=5) mit den intakten kontralateralen Knochen (n=6). Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,4373).	66
35	Vergleich der Steifigkeit der Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt und zwölf Wochen beobachtet wurden (n=5) mit den intakten kontralateralen Knochen (n=6). Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,2752).	66
36	Histologische Schnitte von zwei Femora aus der Gruppe der unbehandelten Defekte mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Bindegewebe und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel	68
37	Histologische Schnitte von drei Femora aus der Gruppe der mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelten Knochen mit einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Fett und Bindegewebe. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel	69

38	Histologische Schnitte von drei Femora aus der Gruppe der mit nicht modifiziertem Fettgewebe behandelten Knochen mit einem Beobachtungszeitraum von zwölf Wochen, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Fett und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, k=Knochen, m=Muskel	70
39	Histologische Schnitte von drei Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Der Beobachtungszeitraum betrug sechs Wochen. Kein Defekt wurde knöchern überbrückt. Im Spalt befinden sich Bindegewebe, Fett und Muskel. Originalvergrößerung 25x. f=Fettgewebe, b=Bindegewebe, k=Knochen, m=Muskel	71
40	Histologische Schnitte von drei Femora, welche mit Ad.BMP-6 aktiviertem Fettgewebe behandelt wurden, gefärbt mit Safranin-O-Lichtgrün. Der Beobachtungszeitraum betrug zwölf Wochen. In allen drei Fällen wurde der Defekt knöchern überbrückt. Im Spalt befindet sich Bindegewebe gespickt mit Knorpel. Originalvergrößerung 25x. b=Bindegewebe, k=Knochen, kn=Knorpel, m=Muskel	72
41	BMP-6-Konzentration nach Transduktion von Fetttransplantaten in vitro, welche 28 Tage kultiviert wurden. Die Messung erfolgte mittels ELISA aus Medium, welches alle drei Tage gewechselt und archiviert wurde. Die BMP-6-Produktion der Fettzellen versiegte zwischen Tag 13 und Tag 18 und erreichte ihren Höhepunkt um Tag 7.	73

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die Funktionen verschiedener BMPs [112]	14
2	Versuchsgruppen MicroCT und Biomechanik	26
3	Versuchsgruppen Histologie	26

Material

Geräte und Instrumente

Akkubohrmaschine	Euromate, D
Analysewaage	Sartorius, D
Autoklav	Sartorius, D
Bohrer 0.9 mm	Gebrüder Brasseler, D
Bohrer für Zahnärzte	Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte, D
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Binder, D
Clipbox	UNIMET, D
Elektrische Pipettierhilfe, accu-jet-pro	Brand, D
<i>Fast Track</i> TM 8874	Instron, UK Table Model axial torsion
Flasche 500 ml	Schott Duran, D
Gefrierschrank -80°C Herafreeze	Heraeus, D
Gefrierschränke -20°C	Liebherr, CH; Bosch, D
Gewebeeinbettautomat, Shandon Hypercenter XP	GMI Inc., USA
Glasgondel	Carl Roth, D
Heizplatte	Medax, D
Isofluranverdampfer mit Sauerstoff- anschluss und Maske	Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte, D
Kirschnerdrähte 1,1 mm	MEDE Technik, D
Kühlschränke +4°C	Liebherr, CH
Küvetten 200ml	Carl Roth, D
Kugelfräse 4,5 mm Durchmesser	Gebrüder Brasseler, D
Lichtmikroskop, Modell Axioskop 40	Zeiss, D
Messvorrichtung Biomechanik, Instron 1	Instron, USA
μ CT 80	Scanco Medical, CH
Microplate Reader Synergy HT	BioTek, D
Nadelhalter	Fine Science Tools, D
Paraffingießmaschine EG 1160	Leica, D
pH Meter HI 122	Hanna Instruments, D
Pinzetten, chirurgisch und anatomisch	Fine Science Tools, D
Pipettierhilfe Pipetman Neo., 0,2-2 μ l, 1-10 μ l, 2-20 μ l, 20-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l	Gilson, USA

Rasierer, elektrisch	Oster, USA
Reinraumwerkbank, HeraSafe	Heraeus, D
Rotationsmikrotom Leica RM 2255	Leica Biosystems, D
Spreitzer	Fine Sience Tools, D
Trockenschrank	Memmert,D
Vortexer	Bender&Hobein AG, CH
Wasserbad	Heraeus, D
Wundklammergerät	Fine Sience Tools, D
Zange	CONMETALL GmbH, D
Zentrifuge, Zellkultur, Multifuge 1 L-R	Heraeus, D

Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien, Medikamente

Abdecktücher, steril, Secu-Drape	Sengewald, D
Adhäsions-Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
Alufolie	Schubert & Weiss, Omnilab, D
Antiseptikum, Braunol	B. Braun Melsungen, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, D
Augensalbe	Bepanthen, Bayer Vital, D
Bacillol AF	Bode Chemie, D
Becherglas	Schott Duran, D
Buprenorphin (Temgesic)	Essex Pharma GmbH, D
Cefuroxim Fresenius 250 mg	Fresenius Kabi Deutschland, D
Deckgläser	Menzel, D
EDTA-4Na 20% Citronensäure	Hausapotheke Klinikum der LMU München, D
Einbettkassetten Biopsie weiß	Resolab, D
Einwegpinzetten, steril, 12,5cm, anatomische Form	Heinz Herenz Medizinalbedarf, D
Einwegskalpelle, steril, 20er und 11er Klinge	Feather disposable scalpel, Feather Safety Razor, J
Erlenmeyer-Kolben	Schott Duran, D
Essigsäure, 100%	Merck, D
Ethanol 40%, 70%, 96% und 100% je in aqua dest.	Apotheke der Universität München, Campus Innenstadt, D
Eukitt	Kindler, D
Färbekästen	Simport, CDN
Faltenfilter Typ 113P	Roth, D
Fast Green FCF pure	Chroma, USA
Formaldehydlösung 4%	Fischar, D
Gesichtsmasken	Mölnlycke Health Care, SE
Gigasept R AF	Schülke & Mayr, D
Handschuhe (steril), Latex Biogel Surgeons	Mölnlycke Health Care, SE
Handschuhe sempercare	Semperit Technische Produkte, A
Incisionsfolie Ioban 2	3M Health Care, D
Insulinspritzen 1ml	Becton Dickinson, USA
Isofluran (Forene)	Abbott, D

Kanülen 25G, BD Microlance 3	Becton Dickinson, USA
Kochsalzlösung (isoton), NaCl 0,9%	Braun, B. Braun Melsungen, D
Kunststoffpulver Technovit 3440	Heraeus-Kulzer, D
Kunststoffliquid Technovit Universal Liquid	Heraeus-Kulzer, D
Laborhandschuhe puderfrei, Größe S	Lohman & Rauscher, AT
Lochtücher, Barrier adhesive aperture drape	Mölnlycke Health Care, SE
Mullkompressen 7,5cm x 7,5cm	NOBA Verbandmittel Danz, D
Nahtmaterial, resorbierbar, 4-0, Vicryl	Ethicon, BE
Natronlauge 1M 1l	MDM Reagenzien und Diagnostika, D
Natriumhydroxid	Merck, D
Objektträger Superfrost plus	Menzel, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Paraformaldehyd, Pulver	Merck, D
Pentobarbital (Narcoren)	Merial, D
Petrischalen, steril 92mm	Nunc, D
Pipettenspitzen 0,2-2 μ l, 1-10 μ l, 2-20 μ l, 20-100 μ l, 50-200 μ l, 100-1000 μ l	Gilson, USA
Rattenfutter „Sniff-Diet“	Fa. Sniff, Soest, D
Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt, D
Rotihistol	Roth, D
Safranin T	Fluka, USA
Salzsäure 1M 1l	Merck, D
Serumpipetten (5mL, 10mL, 25mL)	Corning incorporated, USA
Wägebapier 9x11,5cm	Macherey Nagel, D
Spritzen (steril), 5ml und 20 ml	Braun, D
Streu für Tierkäfig	Fa. Sniff, Soest, D
Wägebapier 9x11,5cm	Macherey Nagel, D
Wunddesinfiziens, Cutasept F	Bode Chemie Hamburg, D
Wundklammern	Fine Sience Tools, D
Zellkulturflaschen, 80cm ²	Nunc, NL
Zentrifugenröhrchen 50ml	Becton Dickson Labware, F
Zentrifugenröhrchen 15ml	TPP, CH

Zellkultur

Amphotericin B Lsg. 250 μ g/ml	Sigma-Aldrich, D
------------------------------------	------------------

Dulbecco's MEM	Biochrom, D
FBS (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, AT
Multiwell, 6-well, 24-well	Nunc, DK
PBS-Puffer Zellkultur, pH 7,4	Biochrom, D
Petrischalen, steril, Nunclon TM , 56,7cm ²	Nunc, DK
Penicillin/Streptomycin 10000 IU/mL / 10000µg/mL	Biochrom, D
Trypsin/EDTA Lsg. 10x 0,5%	Biochrom, D
Zellfilter 100µm, steril	BD Biosciences, B
Zellkulturflaschen, steril, Nunclon TM ,	Nunc, DK
Polystyrene 6-well, 24-well, 175cm ²	
Zusatz Wasserbad Aqua stabil	Julabo Labortechnik, D

ELISA

RayBio [®] ELISA-Kit Human BMP-6	RayBiotech, USA
---	-----------------

Software

Adobe Photoshop CS	Adobe Systems Software, IRL
Adobe Reader V.9	Adobe Systems Software, IRL
Gen5	BioTek, D
GraphPrism	GraphPad Software, USA
Instron 1	Instron, UK
Viva CT	Scanco Medical, CH
Axiovision	Zeiss, D

Zellkulturmedien

Standardmedium:	0,5 l Dulbecco's MEM 50 µl Amphotericin B, 250µg/ml 50 ml FCS (fetales Kälberserum) 10% 10 ml Penicillin/Streptomycin, 10000µg/ml
Transduktionsmedium:	0,5 l Dulbecco's MEM 20 ml Penicillin/Streptomycin, 10000µg/ml 100 µl Amphotericin B, 250µg/ml
Amplifikationsmedium:	0,5 l Dulbecco's MEM mit Glutamin 50 ml FCS, 10% 3,5 ml Penicillin/Streptomycin, 10000µg/ml

Histologie-Protokolle

Entparaffinierung

1. Rotihistol I für 10 min
2. Rotihistol II für 10 min
3. Ethanol 99% I für 5 min
4. Ethanol 99% II für 5 min
5. Ethanol 96% für 5 min
6. Ehtanol 70% für 5 min
7. Aqua dest. für 5 min

Färbeptotokoll - Safranin-O-Lichtgrün

1. Aqua dest. für 5 min
2. Safranin-O 0,015% für 30 sec
3. 6x kurz in Aqua dest. I dippen
4. 6x kurz in Aqua dest. II dippen
5. 6x kurz in Aqua dest. III dippen
6. 0,02% Lichtgrün für 1 min
7. 8x kurz in Essigsäure 1% dippen
8. 6x kurz in Aqua dest. dippen
9. 8x kurz in Ethanol 96% dippen
10. 8x kurz in Ethanol 100% I dippen
11. 8x kurz in Ethanol 100% II dippen
12. 8x kurz in Rotihistol dippen
13. eindecken

ELISA-Protokoll

1. Vorbereitung der Reagenzien, Proben und der Verdünnungsreihe des Standards
2. 100 μ l Standard bzw. Probe auf jedes Well geben und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
3. 100 μ l vorbereiteter Biotin-Antikörper auf jedes Well geben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
4. 100 μ l vorbereitete Streptavidin-Lösung auf jedes Well geben und 45min bei Raumtemperatur inkubieren
5. 100 μ l TMB-One-Step Substrat Reagenz auf jedes Well geben und 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
6. 50 μ l Stop-Lösung auf jedes Well geben und sofort im ELISA-Reader bei 45nm Wellenlänge auswerten

Eidesstattliche Versicherung

Fleischhacker, Evi

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Die Regeneration großer segmentaler Knochendefekte mit Ad.BMP-6 aktiviertem
Fettgewebe*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Garching, 07.12.2015

Unterschrift Doktorandin