

Aus dem Julius Wolff Institut  
der Medizinischen Fakultät Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantifizierung von Wachstumsfaktoren in Bohrmehl,  
Beckenkamm-Spongiosa, Platelet Poor und Platelet Rich  
Plasma

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Herrmann

aus Potsdam

Datum der Promotion: 04.09.2015

# INHALTSVERZEICHNIS

Abstrakt - Deutsche Version .....	4
Abstrakt - Englische Version .....	6
1. EINLEITUNG .....	8
1.1 Frakturheilung und Komplikationen .....	10
1.2 Knochentransplantate .....	16
1.2.1 Autologe Knochentransplantate .....	18
1.3 Platelet Rich Plasma (PRP) .....	22
1.4 Wachstumsfaktoren .....	23
1.4.1 Transforming Growth Factor $\beta$ .....	23
1.4.2 Bone Morphogenetic Protein .....	24
1.4.3 Insulin Like Growth Factor .....	26
1.4.4 Fibroblast Growth Factor .....	27
1.4.5 Platelet Derived Growth Factor .....	27
1.4.6 Vascular Endothelial Growth Factor .....	28
2. MATERIAL UND METHODEN .....	31
2.1 Untersuchungsgut .....	31
2.2 Materialgewinnung .....	32
2.2.1 Bohrmehl und Spülflüssigkeit .....	32
2.2.2 Beckenkammspan .....	34
2.2.3 Blutproben .....	34
2.3 Probenaufarbeitung .....	35
2.3.1 Material .....	35
2.3.2 Bohrmehl .....	35
2.3.3 Beckenkamm .....	36
2.3.4 Platelet-Rich und Platelet-Poor Plasma .....	36
2.3.5 Spülflüssigkeit .....	37
2.4 Bestimmung des Gesamtproteins .....	38
2.4.1 Materialien .....	38
2.4.2 Durchführung .....	38
2.5 Quantifizierung der Wachstumsfaktoren .....	40
2.5.1 Materialien .....	40
2.5.2 Prinzip .....	41
2.5.3 Durchführung der FGFa Analyse .....	42
2.5.4 Vorbehandlung IGF-1 .....	44
2.5.5 Vorbehandlung TGF- $\beta$ 1 .....	44

2.6	Statistische Auswertung .....	45
3.	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Gesamtproteinmenge.....	46
3.2	Wachstumsfaktorkonzentration in Knochenmehl und Beckenkammspan in Bezug auf Probengewicht .....	47
3.3	Wachstumsfaktorkonzentrationen in Platelet Rich Plasma, Platelet.....	52
	Poor Plasma und Spülflüssigkeit bezogen auf Probenvolumen .....	52
3.4	Wachstumsfaktorenkonzentration in Bezug auf Gesamtprotein .....	56
4.	DISKUSSION .....	59
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	59
4.2	Diskussion der Methodik .....	68
4.3	Schlussfolgerung .....	71
5.	LITERATURVERZEICHNIS .....	72
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	84
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	85
8.	TABELLENVERZEICHNIS .....	87
9.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	88
10.	LEBENS LAUF .....	89
11.	PUBLIKATIONEN.....	90
12.	DANKSAGUNG.....	91

## **Abstrakt - Deutsche Version**

### **Einleitung:**

Knochenersatzmaterialien werden zur Therapie von ossären Defektsituationen sowie zur Stimulation der Knochenheilung bei Pseudarthrosen eingesetzt. Der Beckenkammspan ist der Goldstandard des Knochenersatzes. Bei seiner Verwendung sind allerdings die hohe Entnahmemorbidity und die maximal mögliche Entnahmemenge zu berücksichtigen. Eine Alternative ist das beim intramedullären Bohren anfallende Bohrmehl, welches durch ein neuartiges Saug-Spül-Bohrsystem (Reaming-Irrigator-Aspirator(RIA)) gewonnen werden kann. Dieses System ermöglicht die Entnahme einer großen Materialmenge, bei im Vergleich zur Beckenkammspanentnahme geringerer Entnahmemorbidity. Es liegen bisher keine Studien vor, die den Gehalt der für die Knochenheilung relevanten Wachstumsfaktoren in diesen Materialien vergleichend analysieren. Gleiches gilt für die beim Bohrvorgang in großer Menge anfallende Spülflüssigkeit. Als Vergleichsmaterial für die Spülflüssigkeit wurde Platelet Rich- sowie Poor Plasma (PRP; PPP) analysiert. PRP wird im klinischen Alltag analog zu autologen Knochentransplantaten u.a. in der Behandlung von Knochenheilungsstörungen eingesetzt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die quantitative Analyse von acht für die Knochenheilung relevanten Wachstumsfaktoren in Beckenkammspan, Bohrmehl, Spülflüssigkeit sowie PRP und PPP.

### **Methodik:**

Beckenkammspan, Bohrmehl und Spülflüssigkeit von jeweils sieben Patienten wurden zunächst homogenisiert und entsprechend den in Vorversuchen zu erwartenden Proteinkonzentrationen diluiert. Für die Analyse der Plasmaproben wurden von neun Probanden Blutproben gewonnen und in standardisierter Technik zu PRP und PPP verarbeitet. Die Bestimmung der Wachstumsfaktoren erfolgte mittels eines enzymgekoppelten Immunsorptionsverfahrens (ELISA). Die Ergebnisse wurden mit der Gesamtproteinkonzentration sowie dem Probenvolumen bzw. -gewicht korreliert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels T-Test nach Student oder dem ANOVA-Test mit Bonferroni Korrektur mit dem Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ .

### **Ergebnisse:**

Fünf der acht Faktoren (FGFa, PDGF, IGF-I, BMP-2 und TGF-  $\beta$ 1) lagen in dem Bohrmehl in einer im Vergleich zum Beckenkammspan erhöhten Konzentration vor. Zwei der Wachstumsfaktoren (FGFb, VEGF) waren im Beckenkammspan signifikant höher konzentriert.

In der Spülflüssigkeit konnten ebenso Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Sowohl FGFa als auch FGFb waren in der Spülflüssigkeit im Vergleich zum PRP in signifikant höherer Konzentration nachweisbar, wobei FGFa in PRP überhaupt nicht nachweisbar war und FGFb nur in drei PPP-Proben. Die Konzentration der anderen Faktoren war im PRP höher, mit einem signifikanten Unterschied der Konzentration von PDGF und VEGF.

Im PRP lagen des Weiteren VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 in einer im Vergleich zum PPP deutlich höheren Konzentration vor.

#### **Schlussfolgerung:**

Das durch das RIA-Verfahren gewonnene Bohrmehl enthält eine zum Beckenkammspan vergleichbare Menge an Wachstumsfaktoren. Auch in der Spülflüssigkeit lassen sich Wachstumsfaktoren nachweisen, die im Vergleich zum PRP z.T. in vergleichbarer Konzentration vorliegen. Insbesondere das Bohrmehl könnte daher eine valide Alternative zu den bestehenden Knochentransplantaten darstellen.

## **Abstrakt - Englische Version**

### **Introduction:**

Bone grafts are commonly used for treatment of large bony defects and to stimulate bone healing in non-unions. Iliac Crest is referred as Gold Standard, however donor site morbidity and limited graft volume must be considered. The cutting produced by intramedullary reaming via a new Reaming-Irrigation-Aspiration (RIA) device could be another potential source of autogenous graft material. The RIA-system allows harvesting of large graft volumes with low comorbidity compared to the iliac crest harvesting procedure. So far, there are no studies analyzing the content of relevant growth factors in these bony materials. This also applies for irrigation fluid, which accumulates in high volumes during the reaming process. Platelet Rich and Poor Plasma (PRP; PPP) serve as fluid reference samples, as PRP is widely used for the same possible indications. Aim of the current study was therefore to analyze iliac crest, reaming debris, reaming fluid and PRP and PPP for their content of eight growth factors related to bone healing.

### **Methods:**

Iliac crest, reaming debris and irrigation fluid samples of each seven patients were homogenized and diluted according to expected overall protein concentration. For plasma probes blood samples of nine healthy subjects were obtained and processed to PRP and PPP in standardized manner. Determination of growth factor concentration was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These results were normalized to overall protein concentration and the sample weight or volume. Differences in growth factor concentration were determined using the Student's t-test or ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons respectively. Significance level was set at 0.05.

### **Results:**

Five factors showed increased concentrations in the reaming debris compared to the iliac crest samples (FGFa, PDGF, IGF-I, BMP-2 and TGF-  $\beta$ 1) whereas two factors

presented significantly increased concentration in the iliac crest samples. In the reaming irrigation fluid FGFa and FGFb were higher, while VEGF, PDGF, IGF-I, TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 had lower concentrations compared to PRP. FGFa could not be detected in any of the PRP probes and FGFb in only three PRP probes.

Concentrations of VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 were increased in PRP as compared to PPP probes.

**Conclusion:**

Reaming debris harvested by a new Reamer-Irrigation-Aspiration (RIA) system contains comparable amounts of growth factors as compared with iliac crest. These factors can also be found in irrigation fluid, with concentrations comparable to PRP. Reaming debris therefore could be a potential alternative to established bone grafts.

## 1. EINLEITUNG

Knochendefekte können als Folge von Trümmerfrakturen, Tumoren oder in der orthopädischen Revisionschirurgie auftreten. Auch Pseudarthrosen können zu einem Verlust von Knochensubstanz führen. Häufig ist der Funktionserhalt des betroffenen Knochens nur durch die Wiederherstellung der Knochenkontinuität möglich. Treten diese Defekte zudem an langen Röhrenknochen auf, können nicht unerhebliche Längendifferenzen der betroffenen Extremitäten die Folge sein, die den Patienten nicht nur kosmetisch, sondern auch funktionell beeinträchtigen (1). In der Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen kommt dem Einsatz von autologen oder allogenen Knochentransplantaten eine bedeutende Rolle zu. Diese Materialien unterscheiden sich sowohl in ihren biologischen und materialspezifischen Eigenschaften, als auch in ihrer Gewinnung bzw. Herstellung. Von Bedeutung ist hierbei ggf. auch der Gehalt an Wachstumsfaktoren (WF). Wachstumsfaktoren sind Proteine die Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation, Chemotaxis und Apoptose von verschiedenen Zelltypen haben und somit die Regeneration bzw. das Wachstum von verschiedenen Geweben steuern. Von Interesse sind natürlich in den verwendeten Materialien insbesondere die WF die direkten oder indirekten Einfluss auf die Knochenregeneration haben.

Autologe, d.h. patienteneigene Knochentransplantate finden verbreitet klinische Anwendung. Sie sind reich an Wachstumsfaktoren und sind nicht immunogen, d.h. sie lösen keine Immunantwort aus. Goldstandard ist die Verwendung eines Beckenkammspans (2). Dieses Transplantat wird seit Jahrzehnten erfolgreich klinisch eingesetzt. Problematisch ist allerdings die mit der Entnahme einhergehende Komorbidität. Mögliche Komplikationen können von Hämatomen, Verletzung von sensorischen Nerven, anhaltenden Schmerzen bis zur Fraktur des Os Ilium reichen (3, 4). Trotzdem bietet sich der Beckenkamm als Entnahmestelle an, insbesondere da er einfach zugänglich ist. Neben der Entnahmemorbidität ist auch die Limitation der maximal zu entnehmenden Transplantatmenge zu beachten. Aus diesen Gründen sind alternative Entnahmestellen und –techniken weiterhin Gegenstand der klinischen und experimentellen Forschung.

Das Knochenmehl, welches beim Aufbohren langer Röhrenknochen entsteht, könnte eine Quelle für ein autologes Knochenersatzmaterial sein. Das intramedulläre

Aufbohren ist eine Technik, die vor der Frakturversorgung von Femur und Tibia mittels Nagel eingesetzt werden kann. Allerdings wird dieses Aufbohren vor einer Marknagelosteosynthese kontrovers diskutiert (5, 6). Der Vorteil der Markraumaufbohrung ist die Vergrößerung des Markraums, wodurch größere Marknägel verwendet werden können und dadurch auch die Kontaktfläche zwischen Marknagel und Kortikalis größer ist. Beides resultiert in einer höheren Stabilität der Osteosynthese. Des Weiteren wird durch den Bohrvorgang Knochenmehl produziert, welches sich an der Frakturstelle anlagern und somit als autologes Knochentransplantat dienen kann. Nachteile sind jedoch die mit dem Bohrvorgang einhergehenden hohen intramedullären Drücke und auch Temperaturen. Während die Auswirkung der Temperaturentwicklung vor allem lokal, im Sinne von lokalen Gewebsschädigungen und einer Durchblutungsstörung der Kortikalis, in Erscheinung treten können kann es durch die erhöhten intramedullären Drücke zu einer Fettextravasation und in deren Folge zu Fettembolien kommen (7-9). Zur Vermeidung dieser Nachteile, wurde ein neuartiges Bohrsystem entwickelt (Reamer, Irrigator, Aspirator (RIA), Synthes, West Chester, Pennsylvania, USA). Durch das gleichzeitige Spülen und Absaugen des intramedullären Kanals mit 0,9%iger NaCl oder Ringer-Lösung, sollen hohe Druckspitzen vermieden und die Temperatur gesenkt werden. Auch kann so auf eine einfache Art und Weise das beim Bohrvorgang anfallende Knochenmehl gewonnen werden, welches nun als frei verfügbares autologes Knochentransplantat zur Verfügung steht. Erste Studien haben gezeigt, dass dieses Material vitale Zellen enthält und Quelle von Wachstumsfaktoren ist (10, 11).

Neben diesen beiden autologen Knochentransplantaten existiert mit dem Platelet Rich Plasma eine weitere klinisch verfügbare Quelle für autologe Wachstumsfaktoren, die potentiell einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration haben. Dieses Material wird aus autologem, venösen Blut gewonnen, wodurch die potentiell mit den anderen Verfahren einhergehende Komorbidität vermieden wird. Die Aufarbeitung des Materials ist einfach und standardisiert. Es wird klinisch für eine Vielzahl verschiedener Indikationen erfolgreich eingesetzt (12, 13), wobei die Studienlage bezüglich der Effektivität des Materials bisher als unzureichend zu bezeichnen ist (14).

Ziel dieser Studie war es, den Gehalt an verschiedenen, für die Knochenregeneration bzw. Frakturheilung relevanten Wachstumsfaktoren in Beckenkammspan, Bohrmehl,

der beim Bohren anfallenden Spülflüssigkeit, Platelet Rich Plasma und Platelet Poor Plasma zu bestimmen.

Die folgenden Faktoren wurden bestimmt:

- Bone Morphogenetic Protein 2 und 4
- Transforming Growth Factor- $\beta$ 1
- Acidic and basic Fibroblast Growth Factor
- Insulin Like Growth Factor-1
- Platelet Derived Growth Factor bb
- Vascular Endothelial Growth Factor

Für die quantitative Analyse wurde die ELISA (Enzyme linked immunoabsorbend assay) Methode verwendet. Die so bestimmten WF-Konzentrationen wurden mit der Gesamtproteinmenge des jeweiligen Materials ins Verhältnis gesetzt. Die Proteinmenge wurde hierfür separat mittels des Coomassie-Assays bestimmt.

### **1.1 Frakturheilung und Komplikationen**

Eine Fraktur ist eine Unterbrechung der Knochenkontinuität. Ursache sind meist direkte Traumen, wie Stürze, Verkehrsunfälle oder auch indirekte Hebelwirkungen auf den Knochen. Es kann aber bei einem entsprechend vorgeschädigten Knochen auch ohne adäquates Trauma zu einer Fraktur kommen. Man spricht in diesem Falle von einer pathologischen Fraktur. Hier liegen am häufigsten eine ausgeprägte Osteoporose oder auch Primärtumoren im Bereich des Knochens oder Knochenmetastasen zu Grunde.

Die Häufigkeit von Frakturen variiert in Abhängigkeit vom Patientenalter, Geschlecht und der Lokalisation. Die Gesamtinzidenz beträgt 11,67/1000 Einwohner pro Jahr für Männer und 10,65 für Frauen (15). Die häufigste Fraktur des Menschen ist die distale Radiusfraktur. In den westlichen Industrienationen liegt die Inzidenz für einen solchen Bruch bei ca. 2-3/1000 Einwohnern pro Jahr. Die häufigste Fraktur im Bereich der langen Röhrenknochen ist die Tibiaschaftfraktur, deren Inzidenz bei ca. 0,2/1000 pro Jahr liegt und somit nur einen kleinen Teil aller Frakturen ausmacht (16). Nichtsdestotrotz kommt diesen Frakturen eine besondere Bedeutung zu, da

ihre Behandlung mitunter technisch anspruchsvoll und häufig mit Komplikationen assoziiert ist.

Mögliche Komplikationen sind zum einen unmittelbare durch das Trauma bedingte Entitäten, wie z.B. ausgeprägte Weichteilschäden bis hin zum Kompartmentsyndrom, Verletzungen anderer neurovaskulärer Strukturen oder Fettembolien, die durch die Intravastation von Fett aus dem Markraum entstehen. Auch nach der unmittelbaren Verletzung kann es im Verlauf zu einer Vielzahl weiterer Komplikationen kommen. So besteht insbesondere bei offenen Frakturen ein hohes Infektionsrisiko, wobei offene Frakturen ca. 25% der Tibiaschaftfrakturen ausmachen. Insbesondere auch bei diesen Frakturen ist das Risiko einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenheilung erhöht (17).

Die Knochenheilung ist ein komplexer physiologischer Prozess, der nach abgeschlossener Heilung im Gegensatz zu anderen Gewebetypen (Haut, Muskel, etc.), nicht in einer Narbenbildung resultiert, sondern zur vollkommenen Regeneration des Knochengewebes führt. Eine Vielzahl von biologischen Faktoren ist an diesem Prozess in unterschiedlichen Phasen beteiligt.

Bei der Knochenheilung kann zunächst die primäre von der sekundären Frakturheilung unterschieden werden. Die primäre Knochenheilung beschreibt den Prozess der Frakturheilung ohne Bildung von überbrückendem Kallusgewebe. Voraussetzung der primären Frakturheilung ist eine hohe Stabilität der Frakturenenden sowie deren direkter Kontakt bzw. minimaler Abstand von maximal 0,5mm zueinander. Die Heilung erfolgt hierbei durch ein direktes Wiedereinsprossen der Haver'schen Kanäle in die jeweiligen Knochenenden (18). Die Voraussetzungen für die primäre Frakturheilung werden physiologischer Weise nur selten erreicht. Von wesentlich größerer klinischer Bedeutung ist daher die sekundäre oder indirekte Frakturheilung.

Die sekundäre Knochenheilung bezeichnet die Heilung des Knochens mit Bildung eines stabilisierenden, radiologisch sichtbaren Kallusgewebes. Dieses Kallusgewebe besteht u.a. aus Bindegewebe, Chondrozyten und Osteoblasten und enthält auch Anteile von Knochengewebe, und liefert damit die notwendige Stabilität (19). Bei der sekundären Knochenheilung werden typischerweise verschiedenen Phasen durchlaufen: Initial kommt es durch die Fraktur zum Bruch des Knochens und durch die Verletzung von nutritiven Gefäßen zur Ausbildung eines Frakturhämatoms. Dieses Frakturhämatom ist u.a. reich an Wachstumsfaktoren und

spielt eine wesentliche Rolle in der weiteren Frakturheilung (20). Durch die Nekrose von verletztem Gewebe aber auch durch Hypoxie sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF und TGF aus Thrombozyten wird die inflammatorische Phase initiiert. In der Folge migrieren und proliferieren neutrophile Granulozyten, Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten und Mastzellen. Diese Zellen bewirken zum einen eine Resorption von nekrotischem Gewebe, zum anderen die vermehrte Neoangiogenese sowie Ausbildung von kollagenem Bindegewebe. Die Phase, in der dieses weiche Granulationsgewebe gebildet wird, bezeichnet man als Granulationsphase oder auch „weiche“ Kallusphase. Sie dauert beim Menschen ca. 2 Wochen und ist unmittelbare Voraussetzung für die eigentliche Kallusphase. In dieser Phase ist das Vorkommen von Chondrozyten und Osteoblasten durch weitere Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aber auch durch Migration und Proliferation gesteigert. Diese Zellen sind in der Lage Knorpel und Geflechtknochen, der in Folge zunehmend mineralisiert wird, zu bilden. Der Vorgang der Knochenbildung entspricht dabei weitestgehend der embryonalen Knochenbildung (20). Die Kallusformation und Mineralisation dauert beim Menschen zwischen vier und 16 Wochen. Der gebildete Geflechtknochen gewährleistet normalerweise ausreichend Stabilität, um eine partielle Belastbarkeit des Knochens und somit eine vollständige Ausheilung zu gewährleisten(19). Letztendlich schließt sich die Remodelling-Phase an. Hierbei wird kalzifizierter Knorpel und Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgebaut. Dieser ist in seiner Mikrostruktur seiner tatsächlichen Belastung angepasst (21). Des Weiteren wird überschüssiges Kallusgewebe resorbiert. Hierbei ist der Übergang in das physiologische Remodelling des Knochens letztendlich fließend. Das zyklische Durchlaufen von Ab- und Aufbauprozessen führt dann letztendlich idealerweise zur vollständigen Knochenregeneration (Abb. 1).

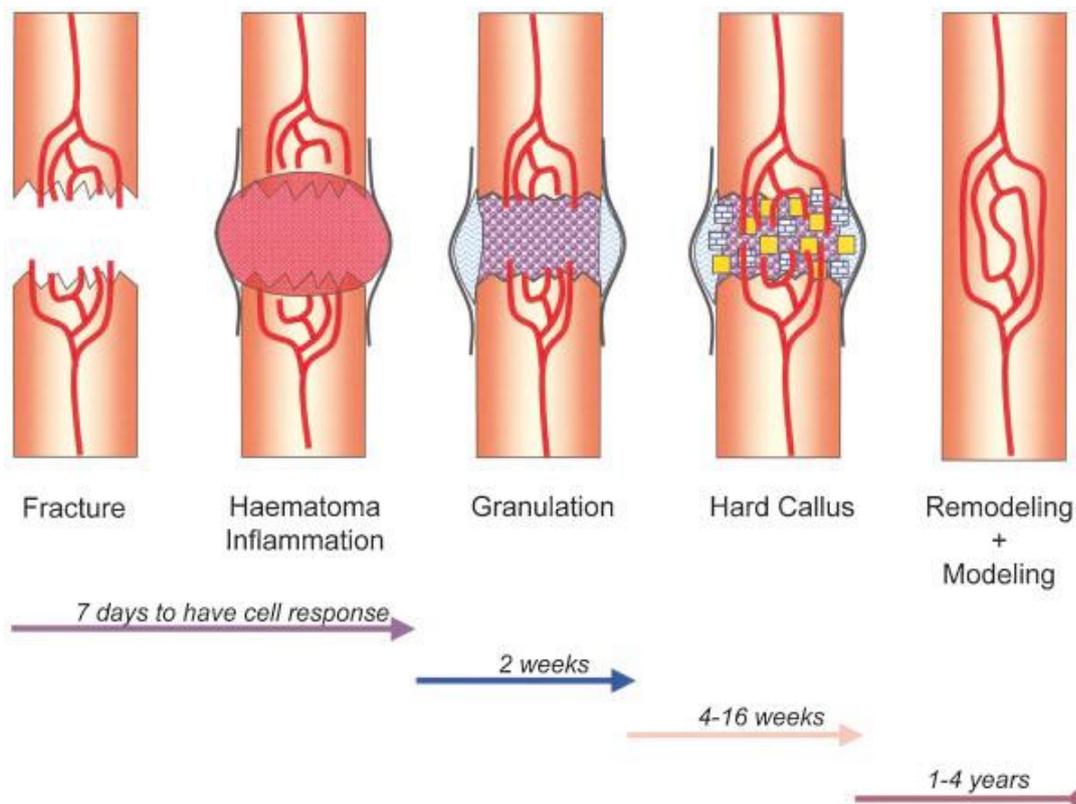


Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen der sekundären Frakturheilung sowie deren Zeitdauer (22)

Obwohl die Mehrzahl der Frakturen problemlos heilt, ist die verzögerte Heilung oder die Ausbildung einer Pseudarthrose eine gefürchtete Komplikation.

Unter einer Pseudarthrose versteht man ein „falsches Gelenk“, welches sich bei einer fehlenden knöchernen Überbrückung der Fraktur ausbildet. Definitionsgemäß spricht man von einer Pseudarthrose frühestens sechs Monate nach dem Frakturgeschehen. Man unterscheidet eine „atrophe“ Pseudarthrose von einer „hypertrophen“. Die letztere ist reich an Kallus und die Frakturenden sind, anders als bei der atrophen Pseudarthrose, gut durchblutet (23). Ursache für die hypertrophe Form ist eine unzureichende mechanische Stabilität bei instabiler Osteosynthese oder eine zu frühe oder inadäquate Belastung (Abb. 2).



Abbildung 2: konventionelles Röntgenbild in zwei Ebenen einer hypertrophen Pseudarthrose am distalen Unterschenkel 11 Monate nach initialer Verletzung(24)

Im Gegensatz dazu, kommt es bei der atrophen Form der Pseudarthrose zu keiner oder nur zu einer minimalen Kallusbildung. Die Ursache der atrophen Form ist nicht vollständig geklärt. Mangelnde oder ungenügende Blutzufuhr scheinen aber eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zu spielen. Weitere Faktoren sind assoziierte Weichteilverletzungen, Substanzverlust des Knochens mit Defektausbildung z.B. bei Trümmerfrakturen, Infektionen, schlechter Allgemeinzustand des Patienten und Rauchen. Die Fraktur ist schließlich mit Narbengewebe überbrückt, dem jegliche osteogene Potenz fehlt (Abb. 3) (25).

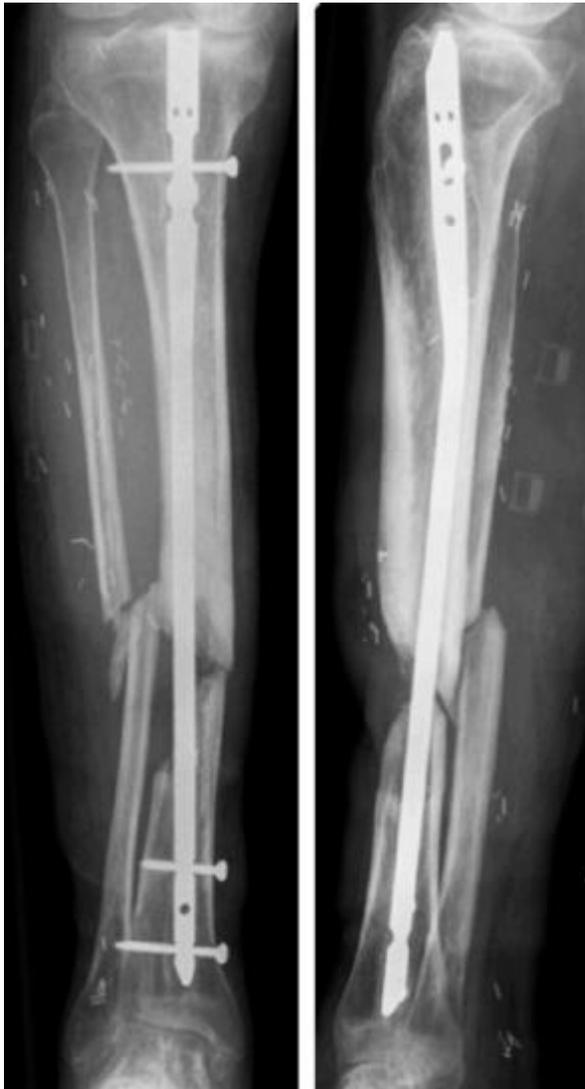


Abbildung 3: Atrophe Pseudarthrose einer Unterschenkelfraktur 16 Monate nach initialer Verletzung im konventionellen Röntgen (24)

Zur Therapie einer Pseudarthrose muss zum einen eine adäquate Stabilisierung sowie ein optimales biologisches Milieu für die Knochenregeneration geschaffen werden. Gleiches gilt natürlich auch für die Therapie eines jeden Knochenbruches, ist jedoch nach Ausbleiben der Knochenheilung von ungleich größerer Bedeutung.

In Abhängigkeit von der Stellung und der Stabilität der Frakturrenden kann die primäre Frakturversorgung in konservativer Form, das heißt z.B. durch Ruhigstellung in einer Gipsschiene oder aber mittels einer chirurgischen Intervention erfolgen. Sind hierbei knöcherne Defekte zu überbrücken, werden nicht selten spongiöse oder kortikale Knochentransplantate verwendet. Die Nutzung solcher Transplantate dient nicht nur dem Auffüllen von Knochen, sondern man geht des Weiteren davon aus, dass die eingesetzten autologen Transplantate der Knochenheilung zuträgliche Substanzen freisetzen (26).

## 1.2 Knochentransplantate

Ein ideales Knochentransplantat wäre: Osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv.

Osteogene Eigenschaften besitzt das Transplantat durch in ihm enthaltene Stammzellen oder Osteoprogenitorzellen, die nach Übertragung des Gewebes zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren (27).

Osteoinduktion bezeichnet den Vorgang durch den die Osteogenese induziert wird (28). Hierbei differenzieren mesenchymale Zellen durch Stimulation mit osteoinduktiven Faktoren zu Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten, die die Fähigkeit haben, neuen Knochen zu bilden (29). Dieser Vorgang kann somit in jedem Gewebe, in dem solche mesenchymale Zellen vorliegen, in Gang gesetzt werden. Urist konnte in den sechziger Jahren zeigen, dass demineralisierte Knochenmatrix osteoinduktiv ist, indem er sie Ratten intramuskulär implantierte und so die Bildung von ektopten Knochen provozierte (Abb. 4). Die von ihm beschriebene Substanz nannte er Bone Morphogenetic Protein (BMP) (30). BMP hat neben seinen starken osteoinduktiven Eigenschaften auch noch eine chemotaktische Wirkung und bewirkt somit nicht nur die Differenzierung sondern auch die Migration von für die Knochenbildung notwendigen Zellen.

Osteokonduktion beschreibt das Einwachsen von Knochen in eine bestehende dreidimensionale Struktur oder Oberfläche, wie z.B. spongiösen Knochen oder Implantat-Oberflächen. Hierbei kommt es zunächst zum Einwachsen von Kapillaren, perivaskulären Weichteilgewebes und zur Migration von Osteoprogenitorzellen in die bestehende poröse Struktur und dann zur Neubildung von Knochen und zur Inkorporation dieser Struktur (31).

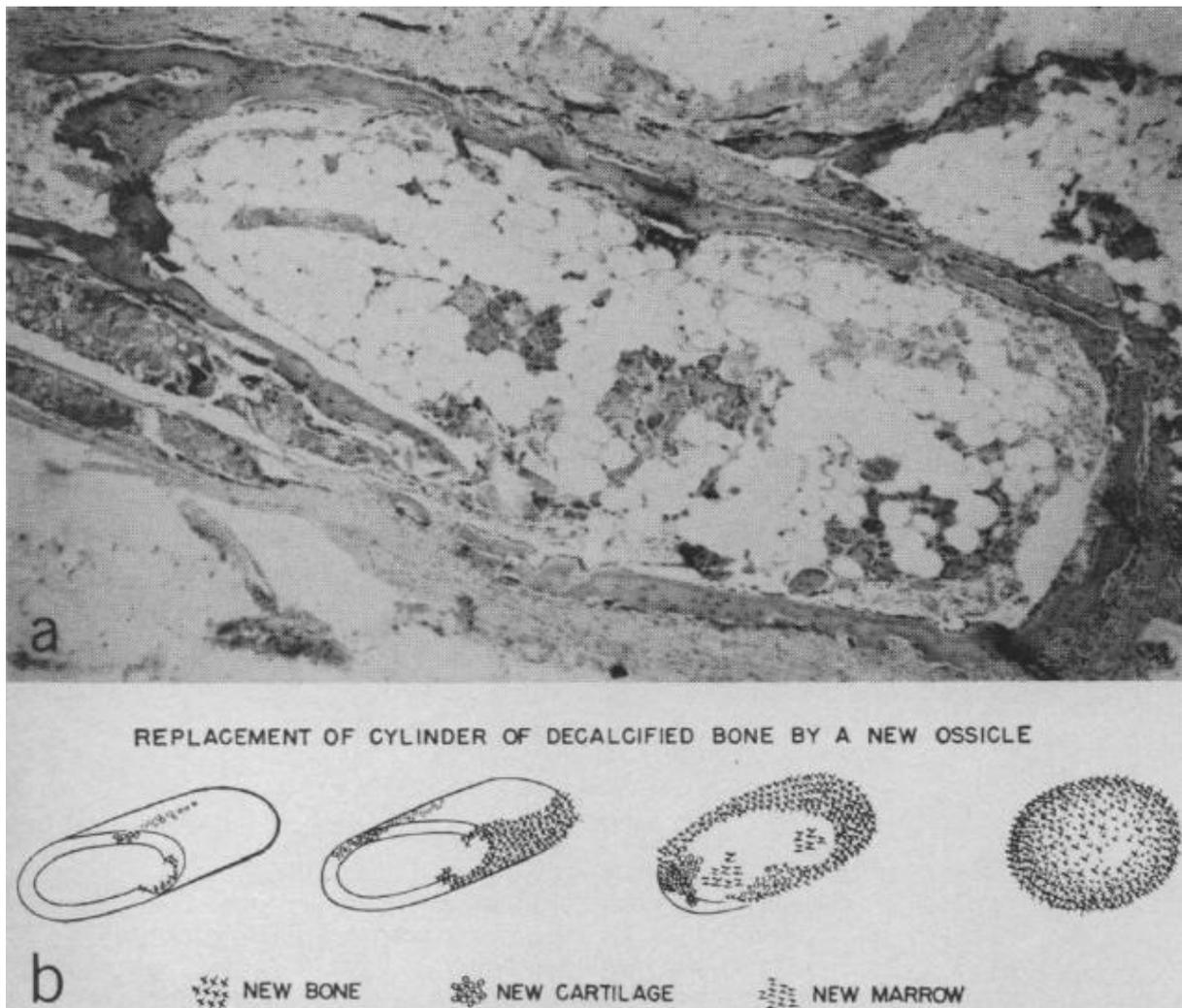


Abbildung 4: (a) Extraossäres Ossikel in der Rektusscheide eines Kaninchens nach Implantation von demineralisierter Knochenmatrix; (b) Schematische Darstellung der Transformation von demineralisierter Knochenmatrix zu neuem Ossikel (Originalabbildung aus (32) )

Prinzipiell kann man autologe, allogene, xenogene und alloplastische Transplantate unterscheiden.

Bei autologen Transplantaten sind Spender und Empfänger des Transplantats identisch. Allogene Transplantate stammen von der gleichen Spezies aber unterschiedlichen Individuen. Bei xenogenen Transplantaten dienen schließlich Individuen einer anderen Spezies als Quelle.

Neben den biologischen Transplantaten steht auch eine Vielzahl synthetisch hergestellter Materialien zur Verfügung. Diese werden als alloplastische Knochenersatzmaterialien bezeichnet. Zu Ihnen zählen auch Materialien, die durch entsprechende chemische oder physikalische Verfahren aus xenogenen Gewebe gewonnen werden. Anwendung finden zum Beispiel Keramiken oder synthetische

Polymere. Gemein ist ihnen ihre ausschließlich osteokonduktive Wirkung. Durch eine Kombination dieser Materialien mit autologen Transplantaten kann aber das Wirkspektrum auch im Sinne einer Osteoinduktion und Osteogenese erweitert werden (33).

### **1.2.1 Autologe Knochentransplantate**

Autologe Transplantate haben osteoinduktive und -konduktive Eigenschaften und sind osteogen, d.h. sie enthalten vitale Zellen, die z.B. zu Osteoblasten differenzieren können. Ein weiterer Vorteil ist ihre Bio-Kompatibilität und die nicht vorhandene Immunogenität.

Es bieten sich verschiedene Knochen für eine mögliche Entnahme an. Dazu zählen neben Fibula und Tibia auch das Olecranon, der distale Radius und die Rippen. Goldstandard ist allerdings weiterhin der Beckenkammspan, da hier vergleichsweise große Mengen an Material entnommen werden können und er leicht zugänglich ist (34).

Ein Nachteil der autologen Knochentransplantate ist die mit der Entnahme einhergehende Komorbidität, die neben den unmittelbaren operativen Risiken auch die möglichen postoperativen Komplikationen, wie Schmerzen und Infektion mit einschließt. Diese möglichen Komplikationen wurden ausführlich in der Literatur beschrieben, wobei ihre Häufigkeit zwischen den einzelnen Studien stark variiert (35, 36). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Schmerz im Bereich der Entnahmestelle zu, der von nahezu allen Patienten unmittelbar postoperativ angegeben wird (37) und bei ca. 20% der Patienten auch über einen längeren Zeitraum persistiert (38). Die Häufigkeit von Infektionen liegt bei bis zu 3% der Fälle, weitere Komplikationen wie Frakturen des Os Illium sind beschrieben, allerdings mit einer noch geringeren Inzidenz (36). Nicht zu vernachlässigen ist allerdings die mögliche Entnahmemenge an der vorderen oder hinteren Beckenschaufel. Diese variiert je nach Lokalisation und Autor zwischen 12cm<sup>2</sup> für den vorderen Anteil bis hin zu 30cm<sup>2</sup> für den posterioren Beckenkamm (39). Problematisch hierbei ist allerdings die Verfügbarkeit nach zuvor bereits stattgehabter Spanentnahme zum Beispiel bei Revisionseingriffen, so dass in diesem Falle auf die Gegenseite, oder aber alternative Entnahmestellen ausgewichen werden muss.

Neben den "klassischen" Transplantaten könnte auch Knochenmehl, welches beim Aufbohren langer Röhrenknochen entsteht, ein mögliches Transplantat mit osteogenen, -induktiven und zum Teil auch osteokonduktiven Eigenschaften sein. Frakturen, die mit einem intramedullären Marknagel versorgt werden heilen schneller und haben eine geringere Rate von Pseudarthrosen, wenn sie zuvor aufgebohrt wurden (5, 40). Hierfür werden verschiedene Gründe postuliert. Zum einen können Nägel mit einem größeren Durchmesser verwendet werden, diese sind steifer und gewährleisten eine bessere Fixation der Fraktur. Außerdem wird beim Aufbohren des Kanals Knochenmehl, Blut und Knochenmark mobilisiert und somit auch in den Bereich der Fraktur gebracht. Die potentiell in diesem Material enthaltenen biologischen Faktoren könnten positiven Einfluss auf die Heilung des Bruches haben (41).

Durch die Einführung eines neuartigen Bohr-Spül-Systems kann dieses Bohrmehl auch außerhalb der originären Entnahmestelle eingesetzt werden. Die Entwicklung dieses Bohrsystems hat ihren Ursprung in den ersten Studien von Danckwardt-Lillieström aus den Jahren 1969-70 in denen erstmals die lokalen und systemischen Effekte des Bohrens vor intramedullärer Nagelung untersucht wurden (42, 43). Diese Arbeitsgruppe war auch die erste, die eine, wenn auch extrem rudimentäre Form des Saug-Spül Bohrers einsetzten: Durch ein gesondertes Knochenfenster wurde der Inhalt des intramedullären Kanals, während des Bohrvorgangs ausgespült (Abb. 5). In diesen tierexperimentellen Arbeit konnte erstmals ein positiver Effekt des Saug-Spül Prozesses gezeigt werden (43). Die Rate an, durch das Bohren hervorgerufenen, letalen Fettembolien war in der Gruppe der mit Spülung aufgebohrten Tiere signifikant geringer. Auch zeigten die ungespült aufgebohrten Knochen Zeichen einer erhöhten Avaskularität. Die Idee des Saug-Spül-Systems wurde durch Stürmer wieder aufgegriffen. Er entwickelte ein Saug-Spül-System, bei dem ein konventioneller, in der Klinik zur Markraumaufbohrung verbreitet eingesetzter Bohrer der AO (Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese) verwendet werden konnte. Die Absaugung wurde wiederum über ein gesondertes Portal bewerkstelligt, die Spülflüssigkeit hingegen über einen kanülierten Führungsdraht eingeleitet. Stürmer konnte nicht nur die Ergebnisse von Danckwardt-Lillieström bestätigen, sondern außerdem auch einen positiven Effekt des Spülvorgangs auf die Viabilität des Knochens belegen (8). Er hatte außerdem erstmals den positiven Effekt des Saug-Spül-Vorgangs auf die Temperatur- und Druckentwicklung beim Bohren belegt.

Das erste Bohrsystem, welches in einem Gerät Saug- und Spülzugang vereinte wurde von Joist und Stürmer entwickelt (44). Auch wenn die tierexperimentellen Untersuchungen an Schafs- und Schweinetibiae vielversprechende Ergebnisse erbrachten, so gab es auch einige technische Probleme, so dass eine klinische Anwendung nicht erfolgte. Das in dieser Studie verwendete Bohrsystem wurde Ende der 90ziger Jahre entwickelt und ist in der klinischen Anwendung (RIA, Reamer Irrigator/Aspirator, Synthes, Paoli, PA, USA). Es vereint die zuvor erwähnten Vorteile der Saug-Spühl-Bohr Systeme mit einer einfachen praktischen Durchführbarkeit. Das mit diesem System gewonnene Bohrmehl ist Quelle von vitalen multipotenten Stammzellen und Osteoblasten (10, 11).

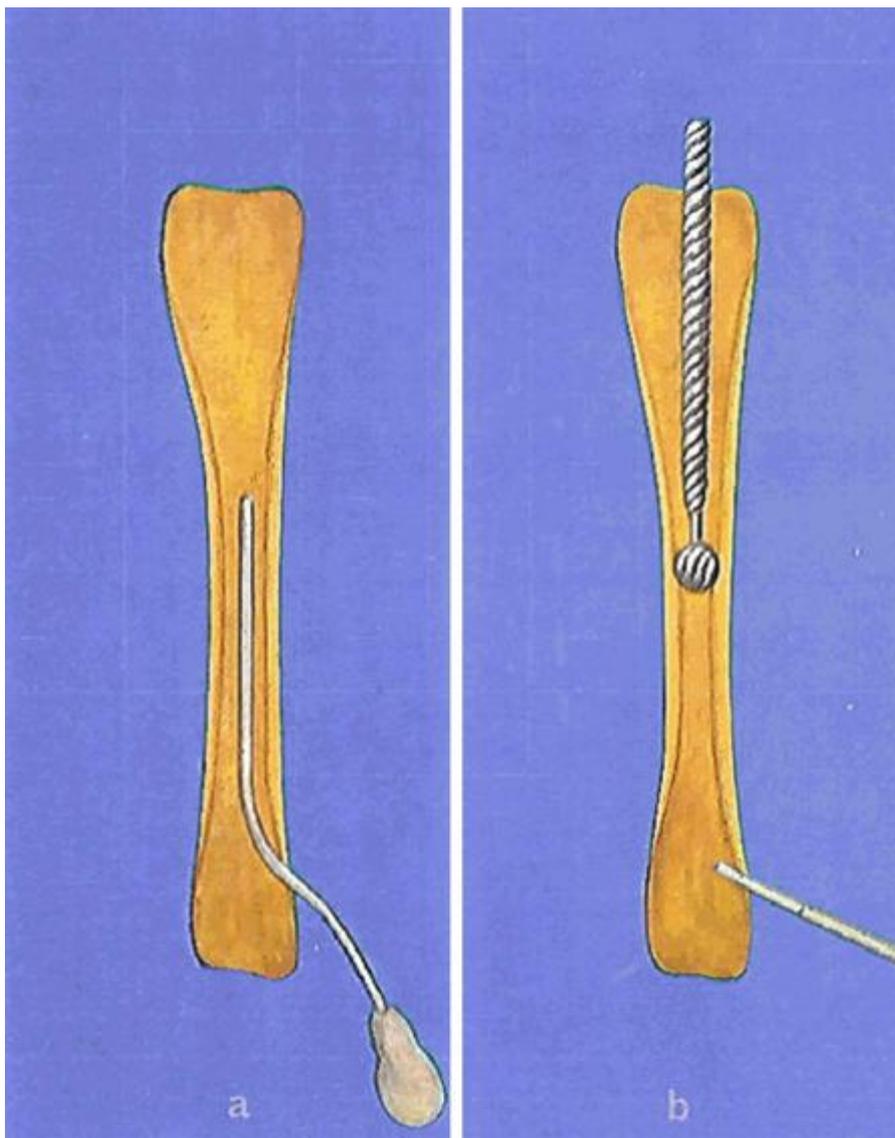


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Bohrvorgangs bei gleichzeitiger Absaugung des intramedullären Kanals aus der Arbeit von Danckwardt, Lilleström et al. aus dem Jahr 1970 (43)

Neben den biologischen Faktoren, wie zum Beispiel dem Gehalt von Wachstumsfaktoren oder aber vitalen Stammzellen, sind für die Effektivität eines Knochentransplantats auch seine mechanischen Eigenschaften von Bedeutung. Der Beckenkammspan hat sowohl kortikale als auch spongiöse Anteile, wobei die kortikalen Bestandteile häufig auch nach Entnahme intakt bleiben und somit als strukturelles Transplantat eine zusätzliche, stabilisierende Funktion haben. Das Bohrmehl setzt sich ebenso aus kortikalen und spongiösen Anteilen zusammen, wobei die kortikalen Anteile naturgemäß nach dem Bohrvorgang keine mechanisch, stützende Funktion übernehmen können. Inwiefern sich Beckenkammspan und Bohrmehl in ihren Verhältnissen von kortikalen und spongiösen Anteilen unterscheiden, ist bisher nicht untersucht worden. Hier sind allerdings auch in Abhängigkeit der Entnahmetechnik interindividuell große Unterschiede wahrscheinlich. Eine Untersuchung des Gehalts dieser Knochentransplantate an Wachstumsfaktoren scheint vor diesem Hintergrund jedoch umso wichtiger.

Allen oben beschriebenen autologen Knochentransplantaten haftet der Nachteil der Ko- bzw. Entnahmemorbidität, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaß, an. Möglicherweise liegen die für die Knochenheilung relevanten Wachstumsfaktoren auch im peripheren Blut vor, so dass dieses ebenso als Quelle von Wachstumsfaktoren dienen könnte. Bekannt ist hierbei die besondere Bedeutung der Thrombozyten(45). Platelet Rich Plasma ist ein Thrombozytenkonzentrat in dem die Konzentration der Thrombozyten im Vergleich zum nativen Plasma auf ein Vielfaches gesteigert ist. Auch der Gehalt an Wachstumsfaktoren ist in diesem Konzentrat im Vergleich zum nativen Plasma um das 3-8 fache erhöht (46). Ein weiterer Aspekt dieser Studie war somit auch die quantitative Analyse der Wachstumsfaktorkonzentration in einem solchen Thrombozytenkonzentrat sowie der Vergleich mit der beim Bohrvorgang anfallenden Flüssigkeit. Die Eigenschaften von Platelet Rich Plasma, einem durch Zentrifugation und Separation hergestelltem Thrombozytenkonzentrat werden in folgendem Kapitel erläutert.

### **1.3 Platelet Rich Plasma (PRP)**

Thrombozyten sind kernlose Zellen im peripheren Blut, die eine zentrale Rolle in der Hämostase sowie der frühen Phase der Wundheilung und der Gewebsregeneration spielen. Sie haben eine Größe von 1,5-3µm und eine scheibenartige Form. Die normale Konzentration von Thrombozyten liegt bei 150 000 bis 350 000/µl.

Platelet Rich Plasma ist definiert als Teil der Blutplasmafraktion, die eine über den Normwerten liegende Konzentration an Thrombozyten hat (46). Dieses Thrombozytenkonzentrat wird durch sequentielle Zentrifugation von autologen venösen Blut gewonnen. Die Thrombozytenkonzentration ist um den Faktor drei bis acht im Vergleich zum normalen Plasma erhöht (47-49).

Es ist reich an Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF) -β1 und -2, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin Like Growth Factor (IGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) (49, 50). Diese Faktoren liegen im PRP im natürlichen, „biologischen“ Verhältnis zueinander vor. Neben den Wachstumsfaktoren enthält das PRP auch andere bioaktive Substanzen wie Serotonin, Histamin, Dopamin und Adenosine, die eine wesentliche Rolle in der Wundheilung und Gewebsregeneration spielen (51).

Aufgrund dieser Eigenschaften wird dem PRP ein positiver Effekt auf die Wundheilung und auch die Knochenheilung zugesprochen. Seit Mitte der neunziger Jahre wird PRP vor allem in der Kieferchirurgie erfolgreich klinisch eingesetzt. Marx et al. konnten 1998 zeigen, dass PRP einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration nach Auffüllung von Kieferdefekten hat. So beschleunigte die Verwendung von PRP zusammen mit einem Knochentransplantat, die Knochenheilung und resultierte in einer höheren Knochendichte, als bei Verwendung des Transplantats alleine (52).

Auch in der orthopädischen Chirurgie findet PRP für viele verschiedene Indikationen Anwendung. Neben der Applikation zur Verbesserung der Knochenheilung wird es z.B. bei der chronischen, therapierefraktären Epicondylitis humeri radialis (53) oder bei der Versorgung von Achillessehnenrupturen eingesetzt (54). Weitere Anwendungen beinhalten den Einsatz zur Verbesserung der Fusionsrate bei Wirbelsäuleneingriffen (55) oder auch der Einsatz bei Umstellungsosteotomien(56) und Distraktionsosteogenesen der unteren Extremität (57). Da das PRP selbst keine

osteogenen Zellen enthält, wird es zur Optimierung der Frakturheilung meist in Kombination mit einem autologen oder allogenen Knochentransplantat eingesetzt (58).

## **1.4 Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren sind Proteine die als Signaltransmitter auf zellulärer Ebene dienen. Sie haben Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung und spielen deshalb eine wichtige Rolle sowohl in der Embryogenese als auch bei der Ausbildung und Regeneration von nahezu allen Organsystemen und somit auch bei der Knochen- und Knorpelbildung, Frakturheilung und bei der Ausbildung von anderen muskuloskeletalen Geweben. Bei der Frakturheilung ist eine Vielzahl dieser Faktoren involviert, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

### **1.4.1 Transforming Growth Factor $\beta$**

Die Transforming Growth Factors (TGF)  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 haben Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von verschiedenen Zellen, wie z.B. mesenchymalen Vorläuferzellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten sowie die Synthese von extrazellulärer Matrix. Sie kommen in erhöhter Konzentration in Knochen, Knorpel und Thrombozyten vor, werden aber von fast allen Zellarten synthetisiert (59). Der Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Frakturheilung geschieht durch verschiedene Mechanismen. So bewirkt TGF- $\beta$ 2 zum einen die Differenzierung von periostalen Zellen zu Chondrozyten. Joyce et al. entdeckten diesen Effekt an einem Rattenmodell nachdem sie den Wachstumsfaktor unter das Periost des Femurs spritzte. Die differenzierten Zellen bildeten nicht nur Knorpel, sondern dieser unterlief in der Folge auch den Prozess der enchondralen Ossifikation. Die so entstandene subperiostale Knorpelformation ähnelte in ihrer Struktur und Differenzierung weitgehend der in der Wachstumsfuge (60). Ein weiterer Effekt des TGF- $\beta$  ist die Steigerung der Apoptoserate von Osteoklasten, wodurch ebenso ein in der Summe anaboler Effekt auf den Knochen erreicht wird (61).

Ein weiterer wesentlicher Mechanismus der TGF- $\beta$  induzierten Knochenbildung ist die endogene Up-Regulation der BMP-2 Expression. Klar et al. haben diesen

Wirkmechanismus in einer Studie an Primaten durch eine intramuskuläre Implantation eines TGF- $\beta$ 3 beladenen Bio-Reaktors mit und ohne rekombinaten Noggin, einen BMP-2 Antagonisten bewiesen. Durch die BMP-2 Hemmung ist es zu einer im Vergleich zur Gruppe ohne Noggin, signifikant geringeren ektopen Knochenbildung gekommen (62). Neben diesem direkten Einfluss auf die Osteogenese bewirkt TGF- $\beta$ 1 des Weiteren eine gesteigerte Expression von VEGF in Osteoblasten, wodurch wiederum die für die Frakturheilung unabdingbare Angiogenese gefördert wird (63).

Bisher gibt es keine Studien zum klinischen Einsatz von TGF- $\beta$ 1 oder  $\beta$ 2 zur Beeinflussung der Knochen- bzw. Frakturheilung. Tierexperimentellen Studien haben jedoch einen positiven Einfluss auf die Knochenkonsolidierung bei Distractionsosteogenese (61) und bei der Regeneration von Schädelknochendefekten(64) gezeigt.

TGF- $\beta$  ist auch bei Patienten mit Lebercirrhose, Kardiofibrose oder chronischem Nierenversagen erhöht (65-67). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der insbesondere mit chronischen Nieren- und Leberversagen assoziierten Osteomalazie und den im Serum erhöhten TGF- $\beta$  Konzentrationen wird postuliert (68). Des Weiteren finden sich während der Knochenheilung insbesondere in der frühen Phase bis zur zweiten posttraumatischen Woche auch im Serum sowie im Frakturhämatom erhöhte Konzentrationen vom TGF- $\beta$ 1. Diese nehmen dann nach der zweiten Woche wiederum kontinuierlich ab (69).

#### **1.4.2 Bone Morphogenetic Protein**

Urist beobachtete 1965 bei Experimenten an Ratten, dass es zu ektoper Knochenbildung im Muskel kommt, wenn man demineralisierten Knochen in Muskelgewebe implantiert. Daraus schlussfolgerte er, dass im demineralisierten Knochen eine Substanz enthalten sein muss, die das Knochenwachstum initiiert (32). Diese Substanz nannte er Bone Morphogenetic Protein (70). Inzwischen konnte nach der Gen-Sequenzierung durch Wozney et al. (71) im Jahr 1988 die Gruppe der BMP's weiter unterteilt werden. Sie alle gehören zusammen mit den Transforming Growth Factor's  $\beta$ 1 bis  $\beta$ 5 und einigen anderen Faktoren zu der TGF- $\beta$  Familie – außer BMP-1. BMPs sind Dimere, die sowohl in Form von Homo- als auch als

Heterodimer vorliegen. Die beiden Proteinketten sind durch Disulfid-Bindungen verbunden.

BMPs haben Einfluss auf Wachstum, Differenzierung, Chemotaxis und Apoptose von verschiedenen Zelltypen, zu denen mesenchymale, epitheliale, hämopoetische und neuronale Zellen gehören. BMP-2, 4 und 7 haben einen direkten Einfluss auf die Frakturheilung, indem sie u.a. die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondro- und Osteoblasten anregen (72). Des Weiteren wird durch BMP-2 die Synthese von VEGF induziert, BMP hat somit indirekten Einfluss auf die Neoangiogenese(73). Im Knochen wird BMP von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Thrombozyten gebildet (74).

Der positive Einfluss auf die Frakturheilung konnte in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien untersucht werden. Hierbei wurde neben der lokalen Applikation, zum Beispiel durch beschichtete Implantate (75) oder Trägermaterialien (76), auch die systemische Gabe untersucht. So haben Einhorn et al. einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung durch eine einmalige perkutane Gabe von BMP-2 erzielen können (77).

Nach den vielversprechenden Ergebnissen in diesen Studien, wurde rekombinantes humanes, also durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen hergestelltes BMP , auch in klinischen Studien erfolgreich zur Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen eingesetzt. So konnten McKee et al. in einer prospektiven, randomisierten Studie durch die Applikation von rekombinanten BMP-7 bei offenen Tibiafrakturen die Heilungsrate signifikant erhöhen (78), Friedländer et al. zeigten, dass durch die Applikation von BMP-7 mit einem Kollagen-Trägermaterial vergleichbare Ergebnisse wie durch die Anlagerung von autologen Beckenkammspan erzielt werden konnten. Auch wenn in dieser Studie kein signifikanter Unterschied bezüglich der Knochenheilung gesehen wurde, konnte aber die mit der Beckenkammspanentnahme einhergehende Komorbidität vermieden werden (79).

Weitere klinische Anwendungen beinhalten zurzeit insbesondere die Applikation in der Wirbelsäulenchirurgie (80, 81).

Im Jahr 2010 erfolgte durch Garrison et al. eine Metaanalyse der vorhandenen klinischen Studie zur Effektivität von BMP in der Behandlung von Frakturen des Erwachsenen. Hierbei wurde insbesondere das Fehlen an unabhängigen Daten bemängelt. Ein Vorteil der Applikation von BMP für akute geschlossene Frakturen

konnte Anhand der aktuellen Studienlage nicht gesehen werden, wohingegen bei offenen Frakturen der Tibia ein möglicher Vorteil besteht (82).

Sowohl BMP-2 (InductOs<sup>®</sup>, Wyeth) als auch BMP-7 (OP-1<sup>®</sup>, Olympus Biotech) haben Zulassungen für die Verwendung in der Therapie verschiedener Entitäten. So ist BMP-2 in der Wirbelsäulen Chirurgie und zur Behandlung von offenen Tibiafrakturen zugelassen (83, 84). BMP-7 hat eine Zulassung für die Behandlung von Pseudarthrosen der Tibia (85). Seit Mitte 2014 wird BMP-7 Des Weiteren werden diese Substanzen erfolgreich im Rahmen eines „Off-Label“ Gebrauchs eingesetzt.

### **1.4.3 Insulin Like Growth Factor**

Zur Gruppe der Insulin Like Growth Factor's (IGF's) gehören zwei strukturell sehr ähnliche Polypeptide, IGF-1 und -2. Sie wirken als Mediatoren für das Wachstumshormon Somatotropin (engl.: Growth Hormon (GH)). Dieses wird aus dem Vorderlappen der Hirnanhangsdrüse nach Stimulation durch Somatoliberin ausgeschüttet. Nachdem es zu den Zielgeweben in Knochen und Leber gelangt ist, bewirkt es dort die Ausschüttung von IGF-1 und -2. IGF spielt, wie auch andere Wachstumsfaktoren eine wesentliche Rolle in der Embryogenese und der postnatalen muskuloskeletalen Entwicklung (86) .

Im Knochen hat IGF-1 eine anabole Wirkung und wirkt vor allem proliferativ auf Osteoblasten(87). Die vermehrte Expression von beiden Formen während der Frakturheilung durch Osteoblasten und Chondrozyten ist ein weiteres Indiz für seine elementare Rolle in diesem Prozess (88). Des Weiteren konnte eine starke chemotaktische Wirkung des IGF-1 auf Osteoblasten bewiesen werden, er fördert somit maßgeblich die Migration dieser Zellen zur Frakturzone (89).

IGF-1 und TGF- $\beta$  haben einen synergistischen Effekt auf die Frakturheilung. Schmidmaier et al. untersuchten den Effekt von IGF-1 allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$  auf die Knochenheilung von Ratten. Hierfür verwendete sie Implantate, die mit o.g. Wachstumsfaktoren beschichtete waren. Während die ausschließlich mit IGF-1 beschichteten Implantate bessere Ergebnisse erzielten als die mit TGF- $\beta$  beschichteten Implantate, kam es bei kombinierter Gabe von IGF-1 und TGF- $\beta$  zu einer signifikant höheren biomechanischen Festigkeit. Auch der Anteil an mineralisiertem Kallus war in dieser Gruppe am höchsten (90).

#### **1.4.4 Fibroblast Growth Factor**

Zu den Fibroblast Growth Factors (FGFs) gehören 23 strukturell ähnliche Polypeptide. Die im Knochen häufigsten sind der acidic Fibroblast Growth Factor (FGFa) und der basic Fibroblast Growth Factor (FGFb). Beide fördern das Wachstum und die Differenzierung von verschiedenen Zellen, insbesondere aber von epithelialen Zellen, Myozyten, Osteoblasten und Chondrozyten (91). Sie spielen damit eine wesentliche Rolle insbesondere in der Einleitung und Kontrolle der Angiogenese. Die Bildung von FGF erfolgt in Fibroblasten, Endothelzellen und auch Mastzellen (92).

Verschiedene tierexperimentelle Studien haben den fördernden Effekt von FGF auf die Knochenheilung belegt: Kato untersuchte an einem Knochendefektmodell am Kaninchen die Kallusmenge und –Mineralisation nach einmaliger Gabe von rekombinanten FGFb. Er beobachtete eine dosisabhängige, signifikante Zunahme beider Parameter zum Zeitpunkt nach 5 Wochen. Auch Radomsky et al. beobachteten eine signifikante Zunahme des Kallusvolumens nach perkutaner Gabe von FGFb an Primaten in einem Defektmodell an der Tibia. Des Weiteren zeigte sich auch ein Vorteil bezüglich der mechanischen Belastbarkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (93, 94).

Inzwischen wurden die Ergebnisse dieser Studien auch in das klinische Umfeld übertragen. So untersuchten Kawaguchi et al. den Effekt von rekombinantem FGFb auf die Knochenheilung nach Umstellungsosteotomie. Im Verlauf wurde die Knochenheilung radiologisch und klinisch evaluiert und dabei eine dosisabhängige Zunahme des Anteils der vollständigen Knochenheilungen im Zeitraum bis zu 16 Wochen beobachtet. Auch der Zeitraum bis zur vollständigen Konsolidierung, d.h. vollständig abgeschlossener Heilung des Knochens war unter Gabe von FGF geringer (95). Die selbe Arbeitsgruppe konnte in einer prospektiven, doppelblinden Studie auch einen positiven Einfluss von FGFb auf die radiologisch evaluierte Frakturkonsolidierung von Tibiaschaftfrakturen zeigen (96).

#### **1.4.5 Platelet Derived Growth Factor**

Der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ist ein Dimer, bestehend aus zwei Polypeptiden (A und B), die durch eine Disulfid-Brücke verbunden sind. Es gibt drei mögliche Dimere: AA, AB und BB. Diese drei Unterformen haben ähnliche

Funktionen. Der größte Teil des PDGF's wird in Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung freigesetzt. Daneben zirkuliert eine geringe Menge frei im Plasma. In der Frakturheilung spielt der PDGF vor allem in der frühen Phase eine essentielle Rolle (97). Nach seiner Freisetzung aus Thrombozyten stimuliert er die Migration mesenchymaler Stammzellen, von Osteoblasten und -klasten und induziert deren Proliferation (98, 99).

Durch die Proliferation der Osteoblasten wird ein direkter, positiver Einfluss auf die Knochenbildung erzielt, während durch die Migration der Osteoklasten und Aktivierung von Makrophagen das Bone-Remodelling beschleunigt wird. Die aktivierten Makrophagen setzen wiederum selbst Wachstumsfaktoren frei (100).

Nash et al. untersuchten erstmals den Effekt dieses Wachstumsfaktors auf die Frakturheilung der Tibia bei Kaninchen. Dazu applizierten sie in eine unilaterale Osteotomie PDGF in einem Kollagen-Trägermaterial. In der so behandelten Gruppe beobachteten sie ein erhöhtes Kallusvolumen und auch eine ebenso erhöhte Kallusdichte als in der Kontrollgruppe. Auch schien auf der mit dem PDGF behandelten Seite die Differenzierung von osteogenen Zellen weiter vorangeschritten zu sein. Einen Unterschied bezüglich der mechanischen Festigkeit konnte aber nicht festgestellt werden (101).

Dahingegen hat Al-Zube et al. an einem Frakturmodell an diabetischen Ratten auch einen Einfluss auf die biomechanische Festigkeit zeigen können. Durch die lokale Applikation von PDGF konnte sowohl die biomechanische Festigkeit nach 8 Wochen (Low-Dose Gabe) als auch das Kallusvolumen nach 12 Wochen (High-Dose Gabe) positiv beeinflusst werden (102). Seit 2009 ist synthetisches PDGF-BB in den USA im klinischen Einsatz (AUGMENT™ BONE GRAFT, BioMimetic Therapeutics, Inc., Franklin, USA).

#### **1.4.6 Vascular Endothelial Growth Factor**

Eine wesentliche Voraussetzung für die Regeneration von Gewebe ist dessen ausreichende Versorgung mit Nährstoffen. Hierzu ist dessen Vaskularisierung unabdingbar.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Wachstumsfaktor mit potenter angiogener und mitogener Wirkung. Er erhöht die vaskuläre Permeabilität, weshalb er ursprünglich auch als Vascular Permeability Factor (VPF) bezeichnet wurde (103).

VEGF wird in der frühen Phase der Frakturheilung von Angioblasten, Osteoprogenitorzellen, Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert (104). Neben seiner angiogenen Wirkung stimuliert der Wachstumsfaktor die Migration und Proliferation von Osteoblasten (105) und hat auch einen direkten Einfluss auf Osteoprogenitor-Zellen (106).

Die elementare Rolle von VEGF's in der Frakturheilung konnte in mehreren tierexperimentellen Studien belegt werden. Street et al haben durch exogene Applikation von VEGF einen positiven Einfluss auf die Angiogenese, Knochenbildung und die Kallus-Mineralisierung in einem Ratten-Fraktur-Modell zeigen können. Den gegenteiligen Effekt erzielte er durch Zugabe eines VEGF Rezeptor-Blockers (107). Ein synergistischer positiver Effekt auf das Kallusvolumen und die Vaskularität konnte für VEGF im Zusammenspiel mit BMP-2 gezeigt werden. Patel nutzte hierfür ein Defektmodell am Rattencranium. Die Defekte wurden mit durch Wachstumsfaktoren angereicherten Trägermaterialien gefüllt und die Vaskularität und Kallusformation durch histologische Untersuchungen sowie Mikro-CT evaluiert (108).

Die Effekte der einzelnen Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Frakturheilung sind in Tabelle 1 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 1: Ursprung, Wirkmechanismus der analysierten Wachstumsfaktoren in der Frakturheilung

<b>Wachstumsfaktor</b>	<b>Ursprung/Wirkmechanismus</b>
BMP-(2,4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung aus Osteoblasten, Osteoprogenitor Zellen, Chondrozyten und Thrombozyten</li> <li>• Bewirken Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondro- und Osteoblasten</li> </ul>
FGF-(a,b)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bildung durch Fibroblasten, Epithelzellen und Matzellen</li> <li>• fördern das Wachstum und die Differenzierung von epithelialen Zellen, Myozyten, Osteoblasten und Chondrozyten</li> <li>• Fördert die Angiogenese</li> </ul>
IGF-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung aus Osteoblasten</li> <li>• Proliferation und Migration von Osteoblasten</li> </ul>
PDGFbb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung aus Thrombozyten</li> <li>• Stimulation der Migration und Proliferation mesenchymaler Stammzellen, Osteoblasten und -klasten</li> </ul>
TGF-β1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung von periostalen Zellen zu Chondrozyten</li> <li>• Steigerung der Apoptoserate von Osteoklasten</li> </ul>
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freisetzung aus Angioblasten, Osteoprogenitorzellen, Chondrozyten und Osteoblasten</li> <li>• Stimulation der Angiogenese</li> <li>• Erhöhung der vaskulären Permeabilität</li> <li>• Stimulation der Migration und Proliferation von Osteoblasten</li> </ul>

Ziel der vorliegenden Studie war es somit die Konzentration von Wachstumsfaktoren in autologen Beckenkammspan, im durch das RIA-System gewonnenen Bohrmehl sowie im Platelet Rich und Poor Plasma zu bestimmen und die Konzentrationen untereinander zu vergleichen. Die Kenntnis dieser Konzentrationen erlaubt erste Rückschlüsse auf das biologische Potential der analysierten Materialien und ermöglicht somit eine optimale Anpassung des therapeutischen Vorgehens bei der Behandlung von Knochendefekten und Pseudarthrosen.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

In der vorliegenden Studie wurde humanes Material, welches Patienten im Rahmen ihres therapeutischen Verfahrens entnommen wurde, analysiert. Die Studie wurde zuvor von dem zuständigen Institutional Review Board (IRB) des Methodist Hospital's, Indianapolis, USA, geprüft und die entsprechenden Erlaubnisse erteilt:

IRB Approval:

- RIA Procedure Approval: 04-021
- Growth Factors: EX 05-1162.1

### **2.1 Untersuchungsgut**

Für die bestehende Studie bestand eine Kooperation mit Dr. Timothy G. Webber vom Health Methodist Hospital (Indianapolis, IN, USA), der die knöchernen Proben zur Verfügung stellte. Von 14 Patienten des Methodist Hospital's wurden Bohrmehl- und Beckenkammspanproben gewonnen. Das mittlere Alter der Patienten, von denen Knochenmehl gewonnen wurde, lag bei 41 Jahren, dabei handelte es sich um zwei weibliche und fünf männliche Patienten. Der Beckenkammspan wurde Patienten entnommen, die im Mittel 47 Jahre alt waren, hier handelte es sich um 4 Männer und 3 Frauen.

Zur Gewinnung des Platelet Rich und Platelet Poor Plasmas wurde neun freiwilligen Spendern des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (Charité Berlin) Blut entnommen. Bei den freiwilligen Blutspendern handelte es sich um zwei Frauen und sieben Männer. Das durchschnittliche Alter betrug 45 Jahre (Tab.2).

Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung

<b>Material</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Anzahl</b>
Bohrmehl	41,1(± 13,1)	2 weiblich,5 männlich	7
Beckenkammspan	47,0(±14,9)	3 weiblich,4 männlich	7
Platelet Rich Plasma Platelet Poor Plasma	45,2(±13,6)	2 weiblich,7 männlich	9

## **2.2 Materialgewinnung**

### **2.2.1 Bohrmehl und Spülflüssigkeit**

Dr. Timothy G. Webber vom Health Methodist Hospital (Indianapolis, IN, USA) war Verantwortlich für die Behandlung der in dieser Studie partizipierenden Patienten. Nachdem die Eignung des Patienten für diese Studie festgestellt wurde, sie über den geplanten Eingriff aufgeklärt und informiert wurden und sie sich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden erklärt haben, wurde der Eingriff am Methodist Hospital, Indianapolis, USA durchgeführt. Zur Gewinnung des Bohrmehls wurde das zum Defekt ipsilaterale Femur operiert, wenn dieses nicht selbst verletzt war. Bei Verletzung des ipsilateralen Femurs wurde der Eingriff am kontralateralen Oberschenkel durchgeführt.

Das verwendete Bohrsystem (Reamer Irrigator/Aspirator, Synthes, Paoli, PA, USA) (Abb. 6) ermöglichte das gleichzeitige Aufbohren, Spülen und Absaugen des Bohrkanals. Das System besteht aus dem Bohrkopf, dem Schlauchsystem mit einem Verteilerstück für den Anschluss von Spülflüssigkeit und Absaugung, der Antriebswelle, hergestellt aus einer flexiblen Nickel-Titan Legierung und einer Dichtung für die Antriebswelle, um ein Eindringen von Flüssigkeit in den Wellenbereich zu verhindern. Den Bohrkopf gibt es in verschiedenen Größen von 12 bis 16,5mm Durchmesser entsprechend den unterschiedlichen Durchmessern des Markkanals. Die einzelnen Größen unterscheiden sich jeweils um 0,5mm. Das Schlauchsystem und die Antriebswelle existieren in zwei Längen: 360 und 520mm,

entsprechend der unterschiedlichen Länge des Markraums. Die Antriebswelle wird über ein Bohrfutter mit dem Bohrer verbunden. Zum Aufbohren wird eine hohe Umdrehungszahl bei geringem Drehmoment benötigt. Prä-operativ wurde der Durchmesser des Markraums anhand von Röntgenaufnahmen des Oberschenkels und einer Messlehre bestimmt, um den entsprechenden Bohrkopf wählen zu können.



Abbildung 6: Bohrkopf des RIA-Systems(Reamer Irrigator/Aspirator, Synthes, Paoli, PA, USA)

Nach Analgosedierung des Patienten wurde das Operationsgebiet gründlich desinfiziert und steril abgedeckt. Als Zugang diente eine 1cm lange Inzision am proximo-lateralen Ende des Femurs. Unter Bildwandlerkontrolle wurde zunächst ein Führungsdraht durch die Fossa piriformis in den Markraum des Oberschenkels eingeführt. Über diesen Führungsdraht wurde dann das Bohrsystem eingeführt und der Knochen bis zu den Femurkondylen aufgebohrt. Dabei wurde mit 0,9 % prozentiger NaCl-Lösung gespült und das Bohrmehl-Flüssigkeits-Gemisch abgesaugt. Nachdem das Bohrmehl von der restlichen Flüssigkeit mit Hilfe eines Siebs getrennt wurde, wurde es in ein steriles Gefäß eingebracht.

Ein Teil des so gewonnenen Bohrmehls wurde in ein 50ml Polypropylene Röhrchen (Falcon Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.J., USA) in eine Pufferlösung aus einem Phosphat-Puffer und einem Proteinase-Inhibitor eingebracht und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zur Herstellung der Pufferlösung wurde eine Tablette Complete Proteinase-Inhibitoren-Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in 25ml PBS

(Phosphate-Buffered Saline) (+P/S (Penicillin / Streptomycin) gelöst. Vor Zugabe der Probe wurde das Röhrchen mit der Pufferlösung gewogen und das Gewicht dokumentiert.

Ein Teil der von der Probe getrennten Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in 50ml Polypropylene Röhrchen gegeben, tiefgefroren und zusammen mit den Knochenmehlproben zur weiteren Analyse nach Berlin versandt.

Der Versand nach Deutschland erfolgte auf Trockeneis gekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gefroren gelagert.

Der größere Teil des Materials wurde als autologes Knochentransplantat zur Versorgung des Knochendefektes eingesetzt.

### **2.2.2 Beckenkammspan**

Die Entnahme von Beckenkammspan erfolgte am Methodist Hospital, Indianapolis, USA. Der entnommene Beckenkammspan wurde als autologes Knochentransplantat zur Versorgung von Knochendefekten verwendet. Vor der Entnahme wurden die Patienten ausführlich über den geplanten Eingriff aufgeklärt und informiert. Der Eingriff wurde nach erfolgter Anästhesie des Patienten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Inzision über der Crista Iliaca wurde ein Knochenspan mit Hilfe einer oszillierenden Knochensäge herausgetrennt. Die klaffenden Knochenflächen wurden mit Knochenwachs verschlossen, um die Blutung aus dem Knochen zu minimieren.

Die Größe des entnommenen Spans variierte in Abhängigkeit von der voraussichtlich benötigten Menge zur Versorgung des Knochendefekts. Ein kleiner Teil des Beckenkammspans wurde nun entsprechend dem Vorgehen bei den Knochenmehlproben in ein 50ml Polypropylene Röhrchen mit der Pufferlösung gebracht, in flüssigen Stickstoff sofort tiefgefroren und auf Trockeneis nach Deutschland gesendet und hier bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **2.2.3 Blutproben**

#### **Material**

- Butterfly Venenpunktionsbesteck (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Multiadapter für S-Monovette (Sarstedt; Nümbrecht, D)

- Desinfektion (Softasept N, Braun, D)
- Stauschlauch
- 20 ml EDTA-K+ Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

### **Durchführung**

Nach venöser Stauung und Desinfektion wurde den freiwilligen Spendern 60 ml Blut abgenommen, welches in EDTA-K+ Monovetten aufgenommen und antikoaguliert wurde. Da die Proben unmittelbar nach Gewinnung weiterverarbeitet wurden, erfolgte keine Zwischenlagerung.

## **2.3 Probenaufarbeitung**

### **2.3.1 Material**

- Präzisionswaage Typ 870-13 (Gottl. Kern & Sohn, Albstadt, Germany)
- Ultra-Turrax T-25 Basic (IKA Werke, Staufen, Germany)
- Eppendorf Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Schwingkugelmühle Typ MM2 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany)
- Thrombozytenkonzentrationssystem GPS (Biomet Inc., Warsaw, Indiana, USA)
- Eppendorf Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Germany)

### **2.3.2 Bohrmehl**

Damit die Konzentration des Bohrmehls in der Proteinase-Inhibitor-Lösung bestimmt werden konnte, wurden die Röhrrchen zunächst gewogen. Da das Leergewicht des Röhrrchens sowie das Volumen des Lösungsmittels bekannt waren, konnte die Menge an Bohrmehl errechnet werden.

Alle Proben wurden im Eisbad in einem Zeitraum von zwei Stunden aufgetaut. Sie wurden dann mit dem Ultra-Turrax bei 24000 Umdrehungen pro Minute für zwei mal

drei Minuten homogenisiert. Um eine Erhitzung der Proben während des Vorgangs zu vermeiden, wurden sie währenddessen im Eisbad gekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C zwischengelagert.

Vor der Analyse wurden die Proben bei 4 Grad Celsius über einen Zeitraum von 2 Stunden eluiert. Hiernach wurden die Proben bei 1400g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in 2ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, so dass für jede Analyse sowie zusätzlich für Vorversuche separate Proben vorhanden waren.

### **2.3.3 Beckenkamm**

Die tiefgefrorenen Beckenkammspan-Proben wurden im Eisbad über einen Zeitraum von zwei Stunden aufgetaut. Mit einer sterilen Pinzette wurde das Gewebe dann in den Metallcontainer der stickstoffgekühlten Schwingkugelmühle überführt und auf Stufe 100 für 3 Minuten gemahlen. Das pulverige Material wurde nun in zuvor gewogene Polypropylene- Röhrcchen überführt und erneut gewogen. Anschließend wurde die ursprüngliche Pufferlösung bis zum Erreichen von einer Konzentration von 100 mg/ml hinzu gegeben. Die Proben wurden bei -80°C zwischengelagert.

Zum Auslösen der Proteine aus dem Knochenmaterial wurden die Proben bei 4 Grad Celsius über 2 Stunden eluiert und anschließend für 10 Minuten bei 1400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in jeweils ein Polypropylene-Röhrcchen für jede Analyse und einige weitere für Vorversuche aliquotiert und bis zur Analyse bei - 80 Grad Celsius gelagert.

### **2.3.4 Platelet-Rich und Platelet-Poor Plasma**

Den Spendern wurde jeweils 60 ml Blut abgenommen, die mit EDTA-K+ antikoaguliert wurden. Die weitere Verarbeitung erfolgte innerhalb von 20 Minuten.

Zur Herstellung des Platelet Rich Plasmas wurde ein kommerzielles Thrombozytenkonzentrations-System (GPS, Biomet Inc , USA) verwendet.

Das Blut wurde in ein hierfür vorgesehenes Röhrcchen gegeben und für 12 Minuten bei 3200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Ein Schwimmkörper in diesem Röhrcchen trennte abhängig von der Dichte das Plasma von den Erythrozyten. Direkt oberhalb dieses Schwimmkörpers lag eine Thrombo- und Leukozytenreiche Phase, der so genannte Buffy-Coat (Abb. 7). Nachdem über einen Zugang das Platelet Poor

Plasma abgenommen wurde, konnten die in dieser Phase enthaltenen Zellen durch Schütteln des Röhrchens für 30 Sekunden in dem verbliebenen Plasmavolumen von ca. 6ml suspendiert werden und nun wiederum über einen separaten Zugang abgenommen werden.



Abbildung 7: Blutproben nach Zentrifugation, die oberste Schicht ist thrombozytenarmes Plasma, in der Mitte erkennt man das Thrombozytenkonzentrat und am Boden die Erythrozyten reiche Phase (Quelle: Biomet, Warsaw, In, USA)

Die Plasmaproben wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße für jede Analyse und einige Vorversuche gegeben und bis zur Analyse bei -80 Grad tiefgefroren.

Um die in den Thrombozyten enthaltenen Wachstumsfaktoren der Analyse zugänglich zu machen, wurden alle Proben vor der Analyse für 30 Sekunden „gepottert“. Dazu wurde ein passgenauer Glasstößel in das Reaktionsgefäß eingeführt und dieser schnell zwischen den Fingern rotiert. Das Thrombozytenkonzentrat befand sich hierbei in einer dünnen Schicht zwischen der Wand des Gefäßes und dem Glasstößel. Durch die entstehenden Scherkräfte kam es zum Platzen der Thrombozyten und zum freisetzen von darin enthaltenen Substanzen.

### **2.3.5 Spülflüssigkeit**

Wie zuvor beschrieben wurde auch ein Teil der beim Einsatz des RIA-Bohrsystems zur Gewinnung des Knochenmehls benutzten Spülflüssigkeit zur weiteren Analyse aufgefangen und tiefgefroren gelagert.

Nach dem Auftauen, welches analog zu den anderen Materialien erfolgte, wurden die Proben für zehn Minuten bei 1400g zentrifugiert, um feste Bestandteile, die durch den Filtervorgang nicht entfernt wurden zu sedimentieren. Der Überstand konnte dann in Polypropylene-Röhrchen für jede Analyse aliquotiert werden. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80 Grad Celsius gelagert.

Analog zum Vorgehen bei den anderen Probenmaterialien wurde die Flüssigkeit vor der endgültigen Analyse zunächst bei 4°C über zwei Stunden eluiert.

## **2.4 Bestimmung des Gesamtproteins**

### **2.4.1 Materialien**

- Coomassie Plus Protein Assay (Pierce, Perbio Science GmbH, Germany)
- 96 Loch-Mikrotiterplatte (Nunc GmbH; Wiesbaden, D)
- PBS- Puffer + Complete Proteinase Inhibitor Cocktail (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz)
- elektronische Mehrkanalpipette (Research Pro, Eppendorf, Germany)
- Microplate Reader (Model 680, Bio Rad, Hercules, Ca, USA)
- Microplate Manager V. 5.02, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA

### **2.4.2 Durchführung**

Um die Ergebnisse der Wachstumsfaktor-Quantifizierung zwischen den einzelnen Proben vergleichbar zu machen, wurden die Konzentrationen aller Faktoren mit der Konzentration von Gesamtprotein in der jeweiligen Probe und dem Probengewicht ins Verhältnis gesetzt. Hierzu wurde das Gesamtprotein aller Proben mit Hilfe des Coomassie-Plus Protein Protokolls bestimmt. Die Methode basiert auf dem von Bradford beschriebenen Verfahren (109).

Zunächst wurde eine Reihe von neun Protein-Standardverdünnungen (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/ml) entsprechend den Anweisungen des Herstellers, hergestellt.

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden jeweils 10µl des Standards oder der jeweiligen Probe gegeben. Alle Proben wurden zweifach bestimmt. In Vorversuchen

hatte sich gezeigt, dass einige der Proben über dem höchsten Standard lagen und mit dem PBS-Puffer verdünnt werden mussten (Tab.3). Diese Verdünnung wurde bei der späteren Berechnung der Konzentration berücksichtigt. Mit einer elektronischen Pipette wurden in jede Vertiefung 300 µl der Coomassie Reagenz hinzu pipettiert und die Platte für 30 Sekunden geschüttelt. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595nm bestimmt. Durch Zuordnung der gemessenen Absorption zu den bekannten Konzentrationen der Standardproben, wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der unbekannt Proben bestimmt werden konnten. Für die genaue Berechnung der Konzentrationen stand eine entsprechende Software zu Verfügung.

Tabelle 3: Verdünnung der Proben zur Gesamtproteinbestimmung

<b>Probe</b>	<b>Verdünnung</b>
Beckenkammspan	1/2
Bohrmehl	1/20
Spülflüssigkeit	1/11
Platelet Rich Plasma	1/100
Platelet Poor Plasma	1/20

## 2.5 Quantifizierung der Wachstumsfaktoren

### 2.5.1 Materialien

- FGFa Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DFA00B)
- FGFb Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DFB50)
- BMP-2 Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DBP200)
- BMP-4 Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DBP400)
- PDGF-BB Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DBB00)
- IGF-1 Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DG100)
- VEGF Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DVE00)
- TGF- $\beta$ 1 Immunoassay Reagenzien (Quantikine, Catalog Number DB100)

Alle Kits von R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Germany

- Harnstoff (  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  )
- 10 molare Natronlauge (10 m NaOH)
- Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)
- 2,5 molare Essigsäure (2,5N  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Merck; Darmstadt, D)
- Mikrotiterplatten-Washer (Immunowash Model 1575, Bio Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA)
- Mikrotiterplattenmeßgerät (Microplate Reader, Model 680, Bio Rad, Hercules, Ca, USA)
- elektrischer Rüttler
- elektronische Mehrkanalpipette (Research Pro, Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Aqua dest. (Braun; Melsungen, D)

## 2.5.2 Prinzip

Zur Quantifizierung der Wachstumsfaktoren

- Insulin Like Growth Factor-I (IGF-I),
- Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1),
- Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2),
- Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4),
- Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB),
- Fibroblast Growth Factor acidic (FGFa),
- Fibroblast Growth Factor basic (FGFb) und
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

wurde die Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunoabsorbend assay) Methode verwendet.

Proben und Standards wurden zunächst in 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben, die mit polyklonalen Antikörpern für die nachzuweisenden Antikörper beschichtet sind. Die in den Proben enthaltenen Wachstumsfaktoren binden an diesen Antikörper. Nachdem alle nicht gebundenen Anteile ausgewaschen waren, wurde ein Enzym gekoppelter, für den jeweiligen Wachstumsfaktor spezifischer, polyklonaler Antikörper hinzu gegeben. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Enzym-Antikörper-Reagenz, wurde eine Substrat-Lösung hinzu gegeben. Entsprechend der Menge von Wachstumsfaktoren, die im ersten Schritt gebunden wurden, erfolgt nun ein unterschiedlich stark ausgeprägter Farbumschlag. Nach Stoppen der Farbreaktion konnte nun die optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge bestimmt werden.

Die von dem Hersteller angegebenen Sensitivitäten der einzelnen Kits für den Nachweis der jeweiligen Wachstumsfaktoren sind in Tabelle 4 dargestellt. Alle Kits wurden vom Hersteller bezüglich ihrer Spezifität für eine Vielzahl weiterer Faktoren getestet. Das Kit für den Nachweis von BMP-2 weist eine Kreuzreaktivität von 1,4% bei einer Konzentration von 50 ng/ml rhBMP-4 auf. Das Kit für den Nachweis von FGFb weist ebenso eine Kreuzreaktivität von 1,15% für FGFa auf. Die anderen verwendeten Kits weisen keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Wachstumsfaktoren auf.

Tabelle 4: Sensitivität gemessen als minimal nachweisbare Dosis (MND) sowie Präzision gemessen in Intra- und Interassay Variationskoeffizienten für die verwendeten ELISA-Kits

<b>WF</b>	<b>MND</b>	Variationskoeffizient (CV) Intraassay	Variationskoeffizient (CV) Interassay
IGF-I	26 pg/ml	3,5-4,3%	7,5-8,3%
TGF- $\beta$ 1	4,61 pg/ml	1,9-2,5%	6,4-9,3%
BMP-2	11 pg/ml	2,4-2,8%	5,3-7,3%
BMP-4	1 pg/ml	3,1-5,3%	5,3-5,8%
PDGF-BB	<15 pg/ml	2,3-4,5%	7,4-8,3%
FGFa	5,68 pg/ml	8,4-8,6%	2,3-7,2%
FGFb	3 pg/ml	3,0-9,7%	7,4-9,1%
VEGF	5 pg/ml	4,5-6,7%	6,2-8,8%

Beispielhaft wird die Quantifizierung von FGFa genau dargestellt. Der Nachweis der anderen Wachstumsfaktoren erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers, wobei sich Inkubationszeiten, verwendete Chemikalien und Verdünnungsfaktoren von der beschriebenen Prozedur unterscheiden können (Tab. 3). Eine Vorbehandlung der Proben erfolgte beim Nachweis von IGF-1 und TGF- $\beta$ 1. Diese Vorbehandlung wird separat detailliert beschrieben.

### 2.5.3 Durchführung der FGFa Analyse

Zunächst wurden die für die Durchführung des Immunoassays nötigen Reagenzien vorbereitet. Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 20 ml des Konzentrates in 500 ml Aqua dest. gelöst.

Die FGFa-Standard Lösung wurde in 1 ml Aqua dest. gelöst und bei Raumtemperatur für 30 Minuten geschüttelt. Die Konzentration dieses Standards lag bei 20 000 pg/ml. Durch Zugabe der Calibrator Diluent RD6X wurden 8 Standards mit absteigenden Konzentrationen hergestellt (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 pg/ml). Die reine Calibrator Diluent RD6X diente als Null-Standard.

Alle für diese Analyse benötigten Proben wurden gleichzeitig bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden alle Bohrmehl- und Beckenkammproben mit

der Calibrator Diluent RD6X im Verhältnis eins zu fünf verdünnt. Die anderen Proben wurden unverdünnt verwendet. Jede Probe, sowie jeder Standard wurden doppelt bestimmt.

In jede Vertiefung der 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden zunächst 150µl der Assay Diluent RD1-77 pipettiert. Anschließend wurden jeweils 50µl des Standards oder der Probe hinzu gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation, nach der alle Vertiefungen viermal mit 400 µl des Waschpuffers unter Verwendung eines Waschautomaten ausgewaschen wurden.

In jedes Well wurden nun 200 µl des FGFa-Enzym-Konjugates pipettiert und für 2 Stunden auf einem Rüttler sachte gerüttelt. Nach Wiederholung des Waschvorgangs, wurden 200 µl des Substrates in die Vertiefung gegeben und die gesamte Platte für 30 Minuten bei Dunkelheit inkubiert.

Die Farb-Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 50 µl der Stopp-Lösung beendet.

Innerhalb von 30 Minuten wurden nun die optische Dichte aller Proben bei 450 nm (Wellenlängenkorrektur 540 nm) mit dem Mikrotiterplattenmeßgerät bestimmt und mittels der zugehörigen Software dokumentiert. Die Berechnung der Standardkurve, sowie der Mittelwerte der Doppelbestimmungen erfolgte automatisch durch die verwendete Software.

Tabelle 5: Volumina von Proben und Assaydiluent und Unterschiede in der Durchführung der einzelnen Immunoassays bezüglich Inkubation und Waschen

<b>Elisa-Kit</b>	<b>Assaydiluent in <math>\mu</math>l</b>	<b>Probenvol. in <math>\mu</math>l</b>	<b>Waschvorg</b>	<b>Waschvorg.</b>	<b>Inkubation</b>
<b>FGFa</b>	150	50	4x	4x	2h
<b>FGFb</b>	100	100	4x	4x	2h
<b>BMP2</b>	100	50	4x	4x	2h
<b>BMP4</b>	100	50	4x	4x	2h
<b>IGF-1</b>	150	50	4x	4x	2h
<b>VEGF</b>	100	100	3x	3x	25min
<b>PDGFbb</b>	100	100	4x	4x	2h
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	0	200	3x	3x	1,5h

#### **2.5.4 Vorbehandlung IGF-1**

Der Insulin Like Growth Factor (IGF-1) ist im Serum und Plasma an Proteine gebunden. Um eine genaue Quantifizierung durchführen zu können, muss dieser Faktor zunächst von den Bindungsproteinen gelöst werden. Dazu wurden zu 20  $\mu$ l der Proben, 380  $\mu$ l der sauren Vorbehandlungslösung A aus dem verwendeten Kit hinzugegeben und anschließend 10 Minuten gut gemischt. 50  $\mu$ l dieser Lösung wurden mit 200  $\mu$ l der Vorbehandlungslösung B neutralisiert. Die Probe wurde gut gemischt und konnte unverzüglich weiter verwendet werden. Bei der späteren Auswertung war zu beachten, dass die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor 100 zu multipliziert waren.

#### **2.5.5 Vorbehandlung TGF- $\beta$ 1**

Um die latente Form des Transforming Growth Factors (TGF- $\beta$ 1) in die aktive, d.h. in die vom Antikörper detektierte umzuwandeln, muss diese mit Hilfe einer Säure

aktiviert und anschließend zur Quantifizierung neutralisiert werden. Zur Herstellung der Säure wurde 100 ml destilliertes Wasser mit 150.2 g Harnstoff gemischt. Langsam wurde 35,9 ml Essigsäure hinzugefügt und wiederum gut gemischt. Mit destilliertem Wasser wurde diese Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 250 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung der neutralisierenden Lösung wurden 140 ml Aqua dest. mit 67,5 ml 10 molarer Natronlauge gemischt. Es wurde dann 59,5 g Hydroxyethyl-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) hinzugefügt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 ml gebracht.

Zur Aktivierung der Proben wurden jeweils 0,1 ml der Probe mit der gleichen Menge der hergestellten Säure gemischt und dann zehn Minuten inkubiert. Zur Neutralisation wurde dann 0,1 ml der Lauge hinzu gegeben. Alle Proben sollten einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,6 nach der Neutralisation haben. Dies wurde mit pH-Indikatorpapier stichpunktartig kontrolliert. Das weitere Vorgehen erfolgte Anhand der Vorgaben zum verwendeten Kit. Die durch die Aktivierung erfolgte Verdünnung der Proben wurde bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 10.0 für Windows. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurden durch den T-Test nach Student oder dem ANOVA-Test mit Bonferroni Korrektur mit dem Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  ermittelt. Hierbei wurde der T-Test für den Vergleich der zwei knöchernen Materialien eingesetzt, der ANOVA-Test zum Vergleich der drei flüssigen Materialien.

### 3. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge sowie die Wachstumsfaktorkonzentrationen in den verschiedenen Materialien präsentiert. Die ermittelten Werte wurden mit dem Gewicht des Knochenmaterials (g: Knochenmehl und Beckenkammspan) bzw. dem Volumen der Flüssigkeiten (ml: Platelet Rich Plasma, Platelet-Poor Plasma, Spülflüssigkeit) ins Verhältnis gesetzt. Des Weiteren wurden die Wachstumsfaktorkonzentrationen aller Proben mit der Gesamtproteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt, da in den verschiedenen Proben von unterschiedlichem Gesamtproteingehalt auszugehen ist.

#### 3.1 Gesamtproteinmenge

Die Gesamtproteinkonzentration lag im Knochenmehl bei 38,8 mg/g. Sie ist somit im Vergleich zum Beckenkammspan um den Faktor 2,1 erhöht. Im Beckenkammspan lag die Gesamtproteinkonzentration bei 18,3 mg/g. Der Unterschied zwischen den knöchernen Materialien war nicht signifikant. Im PRP war die Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zum PPP um den Faktor 1,4 und zur Spülflüssigkeit um das 1,7fache, signifikant erhöht (PRP/PPP:  $p=0,006$ , PRP/Spülflüssigkeit  $p=0,001$ ). Die mittleren Konzentrationen lagen bei 100,4 mg/ml im PRP und 70,9 mg/ml im PPP sowie 56,5 mg/ml in der Spülflüssigkeit (Tab. 6).

Tabelle 6: Gesamtproteinkonzentrationen sowie deren Verhältnis in den analysierten Materialien (\*<sup>1</sup>  $p=0,0006$ , \*<sup>2</sup> $p=0,001$ , ANOVA, Bonferroni)

	mg/g Beckenkammspan	mg/g Knochenmehl	mg/ml PRP	mg/ml PPP	mg/ml Spülflüssigkeit
Gesamtprotein	18,3±4,8	38,8±41,2	100,4± 25,5	70,9±3,3	56.5±19.7
Verhältnis	Knochenmehl/Beckenspan: 2,1		PRP/PPP 1,4, PRP* <sup>1</sup> /Spülflüssigkeit 1,7* <sup>2</sup>		

### 3.2 Wachstumsfaktorkonzentration in Knochenmehl und Beckenkammspan in Bezug auf Probengewicht

Im Folgenden werden die Konzentrationen der analysierten Wachstumsfaktoren in den knöchernen Materialien in Bezug auf das Probengewicht dargestellt. Des Weiteren folgt der Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentrationen zwischen Bohrmehl und Beckenkammspan.

Insgesamt wurde die Menge von 8 Wachstumsfaktoren in den Proben bestimmt. BMP-4 war weder in Beckenkammspan noch im Bohrmehl nachweisbar. Von den sieben nachweisbaren Wachstumsfaktoren lagen fünf (TGF- $\beta$ 1, IGF-1, FGFa, PDGFbb und BMP-2) in dem Knochenmehl in einer höheren Konzentration vor. So war TGF- $\beta$ 1 im Bohrmehl um den Faktor 3,5 erhöht vorliegend, BMP-2 um den Faktor 3,0, PDGFbb um den Faktor 2,9; FGFa war 2,1 fach höher konzentriert und IGF-1 lag in 1,6 fach höherer Konzentration im Vergleich zu Beckenkamm vor. Diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen von VEGF und FGFB im Beckenkammspan signifikant höher (FGFB:  $p=0,0026$ , VEGF:  $p=0,004$ , Abb. 10).

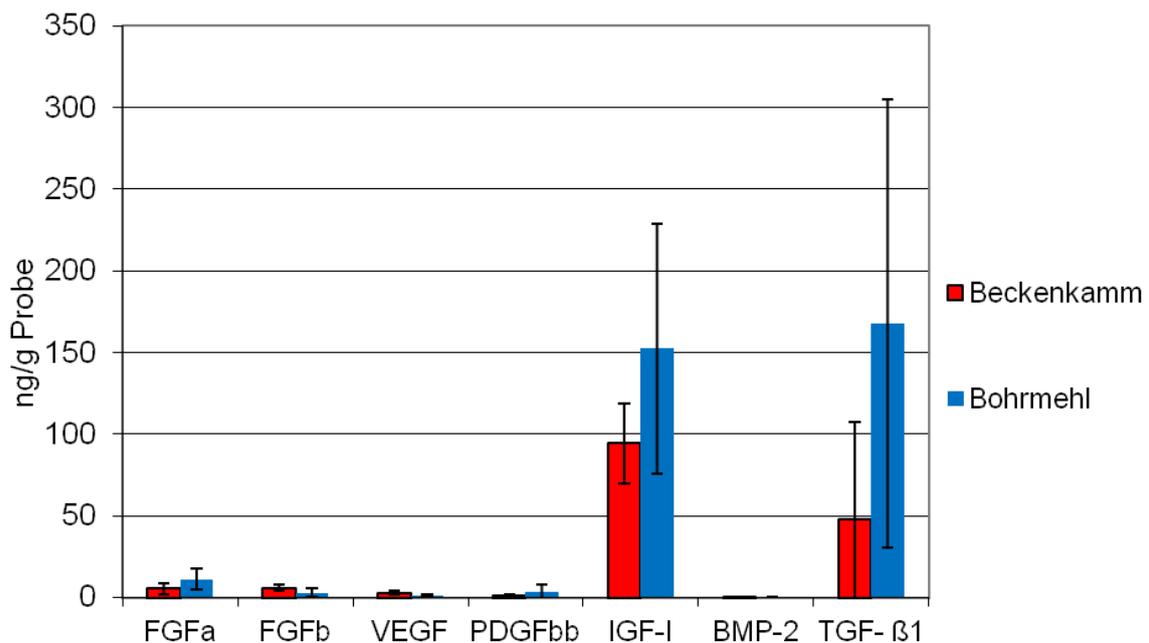


Abbildung 8: Konzentrationen der untersuchten Wachstumsfaktoren im Beckenkammspan und Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht

In den knöchernen Proben lag der Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in der höchsten Konzentration vor (TGF- $\beta$ 1: Bohrmehl: 167,8 ng/g; Beckenkammspan 48,0 ng/g

Probe). Auffällig ist hier die enorme Streuung der Werte insbesondere in den Bohrmehlproben: Während die höchste Konzentration bei über 417,0 ng/g Probe lag, war die Geringste um den Faktor 63 kleiner bei 6,6 ng/g Probe. In einer der Proben war der TGF- $\beta$ 1 gar nicht nachweisbar. Dementsprechend ist die Standardabweichung für diesen Faktor hoch (137,1 ng/g Probe). In den Beckenkammproben konnte TGF- $\beta$ 1 in allen Proben nachgewiesen werden und die Standardabweichungen war mit 59,3 ng/g Material niedriger als im Bohrmehl. Bezüglich der TGF- $\beta$ 1 Konzentration gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Materialien (Abb. 9).

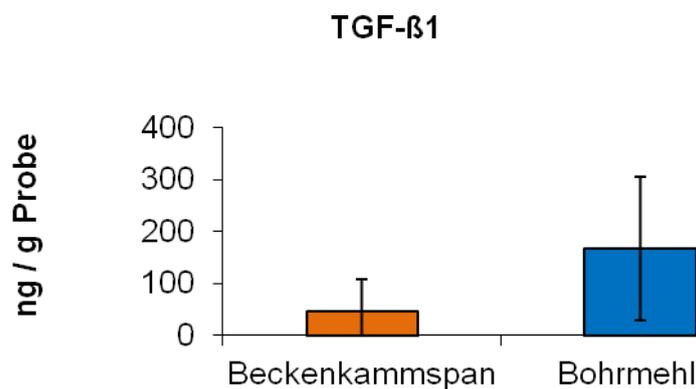


Abbildung 9: 3,5 fach höhere Konzentration von TGF- $\beta$ 1 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht

IGF-1 war mit 152,4 ng/g Material im Bohrmehl und 94,4 ng/g Material in den Beckenkammspanproben messbar. Die Streuung der Werte fällt hierbei im Vergleich zum TGF- $\beta$ 1 deutlich geringer aus, woraus auch die geringere Standardabweichung von 76,5 ng/g für die Bohrmehlproben und 24,3 ng/g Material bei den Beckenkammproben resultiert. Auch ist der Faktor in allen Proben nachweisbar gewesen (Abb. 10).

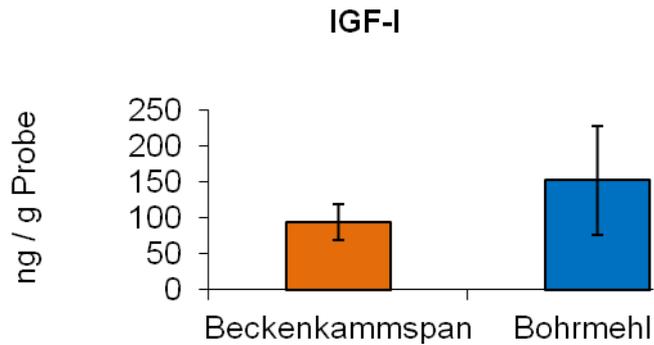


Abbildung 10: 1,6 fach höhere Konzentration von IGF-1 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht

In geringerer Konzentration konnten FGFa und -b nachgewiesen werden. Im Bohrmehl lag die Konzentration von FGFa bei 11,2 ng/g Probe, in den Beckenkammproben bei 5,5 ng/g Probe. Während in den Bohrmehlproben der Nachweis von FGFa in einer Probe nicht gelang, war der Faktor in allen Beckenkammproben nachweisbar. Die Konzentration von FGFb in den Bohrmehlproben lag bei 2,9 ng/g Probe, in den Beckenkammproben bei 6,0 ng/g Material. Dieser Unterschied war signifikant ( $p=0.026$ ). Dieser Faktor war in beiden knöchernen Materialien in allen Proben nachweisbar (Abb. 11, 12).

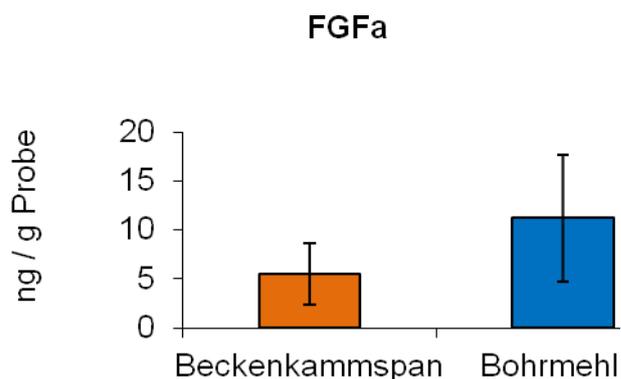


Abbildung 11: 2,1 fach erhöhte Konzentration von FGFa (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht

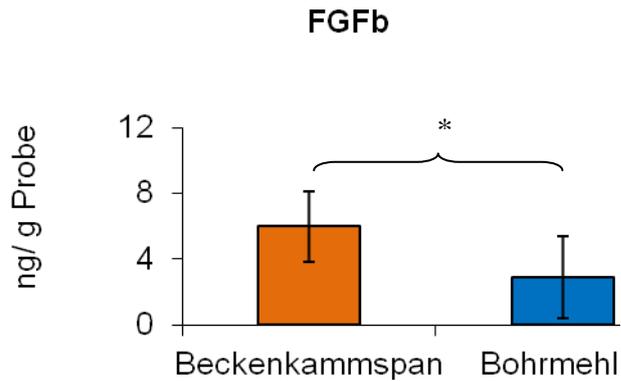


Abbildung 12: Signifikant höhere Konzentration von FGFb (ng/g Probe) in Beckenkammspan im Vergleich zum Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht (\*p=0.026; t-Test)

PDGFbb konnte mit einer Konzentration von 3,7 ng/g Probe in den Bohrmehlproben und 1,3 ng/g in den Beckenkammproben nachgewiesen werden, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war. Jedoch war auch bei diesen Analysen eine große Streuung zu beobachten. Diese imponierte insbesondere bei den Bohrmehlproben bei denen die niedrigste Konzentration bei 0,06 und die höchste bei 13,7 ng/g Probe lag. Dies entspricht der 238fachen Konzentration. In zwei Bohrmehlproben konnte PDGFbb gar nicht nachgewiesen werden, während der Nachweis in allen Beckenkammproben gelang (Abb. 13).

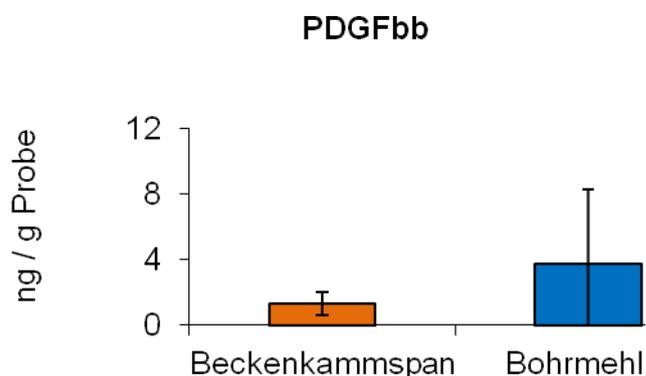


Abbildung 13: 2,9 fach erhöhte Konzentration von PDGFbb (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht

VEGF wies im Bohrmehl eine Konzentration von 1,4 ng/g Probe auf und lag somit im Vergleich zum Beckenkammspan, in dem die Konzentration 3,1 ng/g betrug, in signifikant geringerer Konzentration vor (p=0.004). Dieser Faktor war in allen Proben nachweisbar (Abb. 14).

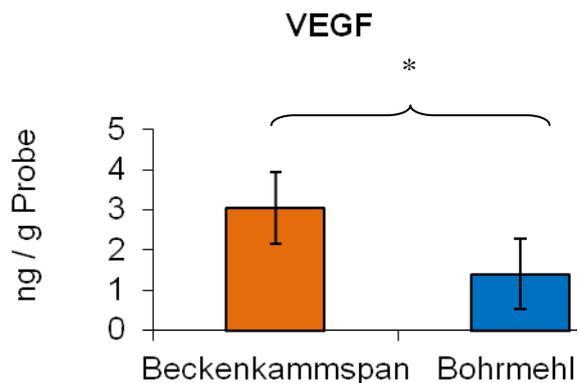


Abbildung 14: signifikant höhere Konzentration von VEGF (ng/g Probe) in Beckenkammspan im Vergleich zu Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht (\* p=0,004 ; t-Test)

BMP-2 war nur in drei der acht Bohrmehlproben und in einer Beckenkammprobe nachweisbar. Die bestimmten Werte lagen in den Bohrmehlproben zwischen 0,031 und 0,13 ng/g Probe, was in einer mittleren Konzentration von 0,071 ng/g Probe resultierte. In der Beckenkammprobe lag die Konzentration bei 0,023 ng/g Probe zwar unter der in dem Bohrmehl nachgewiesenen Menge, wobei die Differenz von 0,048 pg/g gering ist (Abb. 15).

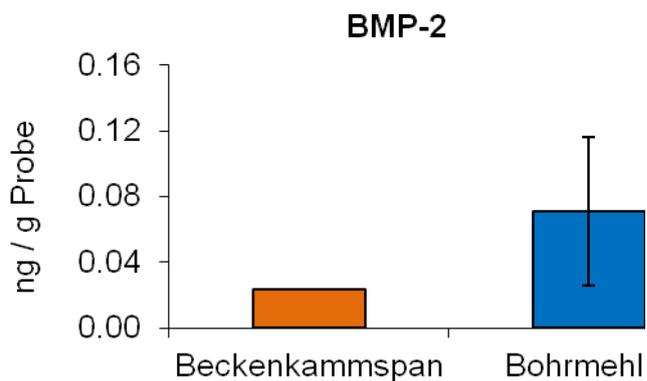


Abbildung 15: 3,0 fach höhere Konzentration von BMP-2 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht

### 3.3 Wachstumsfaktorkonzentrationen in Platelet Rich Plasma, Platelet Poor Plasma und Spülflüssigkeit bezogen auf Probenvolumen

Im Folgenden werden die Konzentrationen der untersuchten Wachstumsfaktoren sowie deren Verhältnis in den flüssigen Proben normalisiert auf das Probenvolumen beschrieben. Auch in den flüssigen Proben war kein Nachweis von BMP-4 möglich. Des Weiteren konnte FGFa nicht in PRP oder PPP nachgewiesen werden, wohingegen die Konzentration in der Spülflüssigkeit bei 0,22 ng/ml Probe lag.

Der in höchster Konzentration vorliegende Wachstumsfaktor im Platelet Rich Plasma war der Insulin Like Growth Factor (IGF-1). Dessen Konzentration lag bei 208,5 ng/ml mit einer Standardabweichung von 76,5 ng/ml. Auch in den anderen flüssigen Proben war dieser Faktor am höchsten konzentriert, wobei die mittlere Konzentration im PPP über der im PRP lag (223,0 ng/ml). In der Spülflüssigkeit lag eine Konzentration von 91,1 ng/ml vor und war somit im Vergleich zum PPP signifikant verringert (PPP vs. Spülflüssigkeit:  $p=0,03$ ). IGF-1 konnte in jeweils allen Proben nachgewiesen werden (Abb. 16).

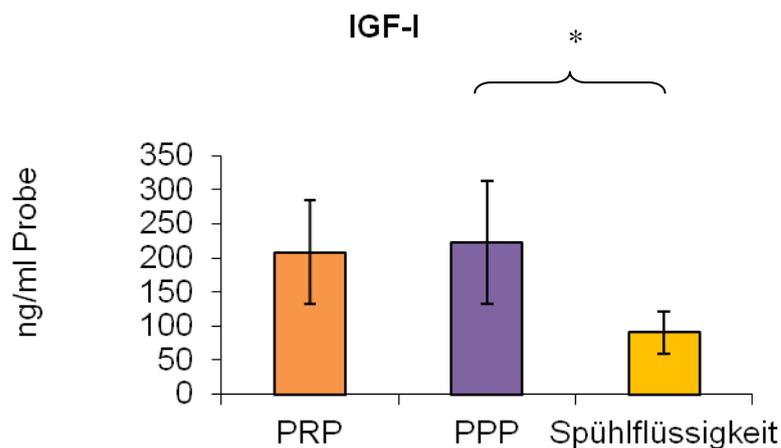


Abbildung 16: Konzentration von IGF-1 (ng/ml) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (PPP vs. Spülflüssigkeit:  $p=0,03$  (ANOVA, Bonferroni))

In nächst niedrigerer Konzentration war im PRP und PPP der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 zu messen, dessen Konzentrationen bei 107,7 ng/ml (PRP) bzw. 8,0 ng/ml (PPP) Material lagen. Dieser Faktor lag im PPP mit einer im Vergleich zum PRP um den Faktor 13,5 signifikant verringerten Konzentration vor (PRP vs. PPP:  $p<0,001$ ). In der

Spülflüssigkeit war der Faktor noch in einer Konzentration von 64,4 ng/ml nachweisbar (Abb. 17).

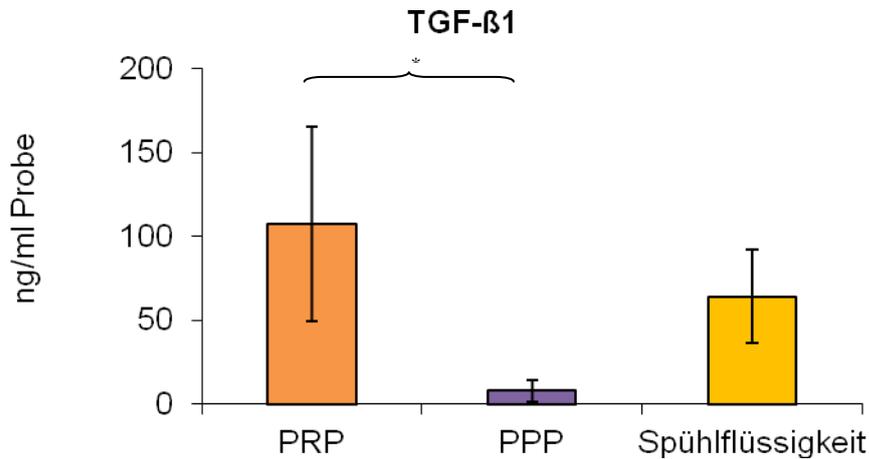


Abbildung 17: Konzentration von TGF-β1 (ng/ml) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (\* PRP vs. PPP:  $p=0,002$  (ANOVA, Bonferroni))

Sowohl im PRP als auch im PPP folgten PDGFbb und VEGF in den nächst niedrigeren Konzentrationen. Im PRP lag die mittlere Konzentration von PDGFbb bei 7,5 ng/ml bei einer Standardabweichung von 4,2 ng/ml. Diese Konzentration war im Vergleich zum PPP und zur Spülflüssigkeit signifikant erhöht (PRP vs. PPP:  $p<0,001$ ; PRP vs. Spülflüssigkeit:  $p=0,002$ ). Im PPP lag die Konzentration bei 0,33 ng/ml und war somit um den Faktor 23,2 geringer. Die PDGFbb-Menge war in der Spülflüssigkeit mit einer Konzentration von 0,83 ng/ml im Vergleich zum PPP höher, wobei der Unterschied keine statistische Signifikanz aufweist (Abb. 18).

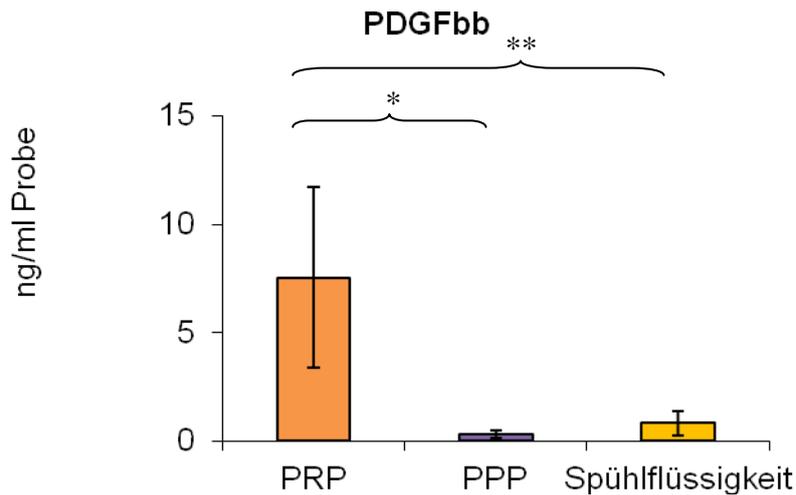


Abbildung 18: Konzentration von PDGFbb in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (\* PRP vs. PPP:  $p < 0,002$ ; \*\* PRP vs. Spülflüssigkeit:  $p = 0,002$  (ANOVA, Bonferroni))

Die Konzentration des VEGF lag bei 1,3 ng/ml im PRP und ist somit 51,7 fach höher konzentriert als im PPP, in dem die mittlere VEGF-Konzentration bei 0,025 ng/ml Probe lag. In der Spülflüssigkeit betrug die Konzentration 0,17 ng/ml und lag somit zwischen den beiden anderen Flüssigkeiten. Der Unterschied zwischen PRP und den anderen flüssigen Proben fällt jeweils signifikant aus (PRP vs. PPP und Spülflüssigkeit  $p < 0,001$  (ANOVA, Bonferroni)) (Abb. 19).

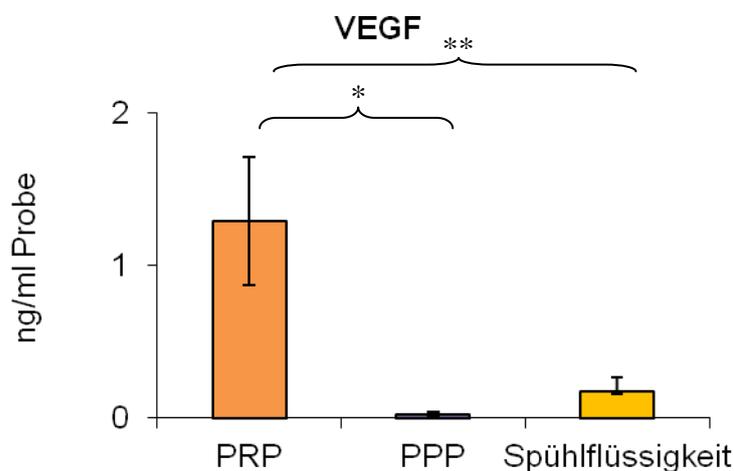


Abbildung 19: Konzentration von VEGF (pg/ml) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (\*, \*\* PRP vs. PPP und Spülflüssigkeit  $p < 0,001$  (ANOVA, Bonferroni))

FGFb lag sowohl im PRP als auch im PPP nur in geringer Konzentration vor. Diese betrug im PRP 0,050 ng/ml und im PPP lediglich 0,003 ng/ml. Des Weiteren konnte dieser Faktor im PPP nur in drei von acht Proben nachgewiesen werden. In der Spülflüssigkeit lag FGFb im Vergleich zu den anderen flüssigen Proben in signifikant höherer Konzentration vor. Diese lag bei 0,43 ng/ml und ist somit im Vergleich zum PRP um den Faktor 8,3 höher (Spülflüssigkeit vs. PRP:  $p=0,011$ ; Spülflüssigkeit vs. PPP:  $p=0,002$  (ANOVA, Bonferroni) (Abb. 20).

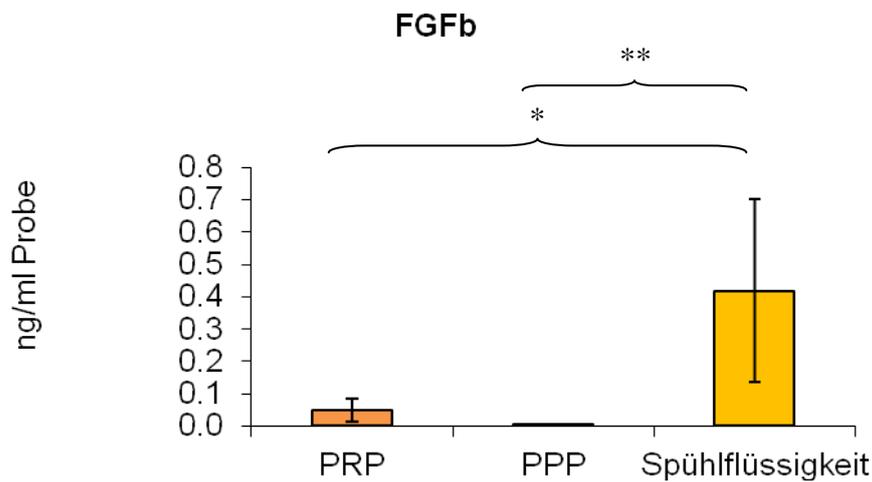


Abbildung 20: Konzentration von FGFb (ng/ml) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (Spülflüssigkeit vs. PRP:  $p=0,011$ ; Spülflüssigkeit vs. PPP:  $p=0,002$  (ANOVA, Bonferroni)

In allen flüssigen Proben konnte BMP-2 nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen bei 0,028 ng/ml im PRP, 0,015 ng/ml im PPP und 0,008 ng/ml in der Spülflüssigkeit. Es bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich der BMP-2 Konzentration zwischen den flüssigen Materialien (Abb. 21).

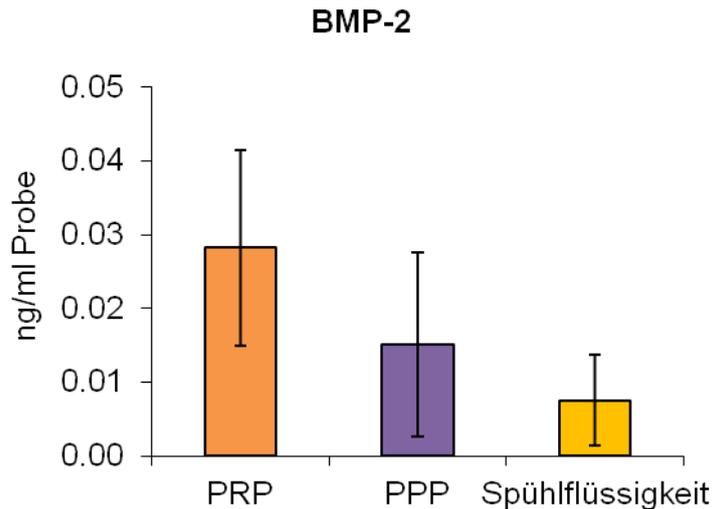


Abbildung 21: Konzentration von BMP-2 (ng/ml Probe) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit

### 3.4 Wachstumsfaktorenkonzentration in Bezug auf Gesamtprotein

Neben der Normalisierung auf das Gewicht bzw. die Flüssigkeitsmenge erfolgte die Normalisierung der Wachstumsfaktorkonzentrationen auf die Gesamtproteinkonzentration. Die Ergebnisse für die Normalisierung auf die Gesamtproteinmenge sind in Abb. 22 und 23 zusammenfassend dargestellt und sollen in Folge kurz erläutert werden:

IGF-1 lag in allen Proben in hoher Konzentration vor, wobei die höchste Konzentration in den knöchernen Materialien gefunden wurde (Beckenkammspan: 6178 pg/g Protein; Bohrmehl: 6185 pg/g; PRP: 2056 pg/g; PPP: 3162 pg/g; Spülflüssigkeit: 1619 pg/g). Diese Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant.

Die TGF- $\beta$ 1 Konzentration lag in den knöchernen Proben in ähnlicher Konzentration vor (Beckenkammspan: 2789 pg/g; Bohrmehl: 6770 pg/g). In den flüssigen Proben war die TGF- $\beta$ 1 Konzentration im PPP im Vergleich zu den übrigen Proben signifikant geringer (PRP: 1107 pg/g; PPP: 112 pg/g; Spülflüssigkeit: 1309 pg/g; Signifikanz: PRP vs. PPP:  $p=0.002$ ; Spülflüssigkeit vs. PPP:  $p=0.01$ ).

FGFa und b lagen in den knöchernen Materialien in deutlich geringeren Konzentrationen als IGF-I und TGF- $\beta$ 1 vor. So betrug die Konzentration von FGFB 455 pg/g im Beckenkammspan und 89 pg/g im Bohrmehl. FGFa konnte mit einer

Konzentration von 312 pg/g (Beckenkammspan) und 410 pg/g (Bohrmehl) nachgewiesen werden. In den flüssigen Proben konnte FGFa lediglich in der Spülflüssigkeit in geringer Konzentration nachgewiesen werden (3,9 pg/g). FGFb war nur in drei von acht PPP Proben in niedriger Konzentration zu detektieren und lag auch in den anderen flüssigen Proben nur in niedriger Konzentration vor (PRP: 0,6 pg/g; Spülflüssigkeit: 8,7 pg/g).

Die höchste Konzentration von VEGF wurde im Beckenkammspan gefunden, im Bohrmehl war die Konzentration um den Faktor 4,7 nicht signifikant verringert (Beckenkammspan: 218 pg/g; Bohrmehl: 46 pg/g). In den flüssigen Proben lagen die VEGF- Konzentrationen bei 13 pg/g im PRP, 0,3 pg/g im PPP und 3,2 pg/g in der Spülflüssigkeit, wobei die Unterschiede zwischen PRP und den anderen Proben jeweils signifikant sind (PRP vs. PPP  $p < 0,001$ ; PRP vs. Spülflüssigkeit  $p = 0,002$ ). PDGFbb wurde im Beckenkammspan mit einer Konzentration von 73 pg/g Protein und im Bohrmehl mit einer Konzentration von 89 pg/g Protein nachgewiesen. In den flüssigen Proben lag dieser Faktor im PRP in einer im Vergleich zu den anderen Materialien signifikant höheren Konzentration vor (PRP: 83 pg/g; PPP: 4,6 pg/g; Spülflüssigkeit: 13,7 pg/g)(PRP vs. PPP,  $p = 0,0025$ ; PRP vs. Spülflüssigkeit,  $p = 0,015$ ).

BMP-2 wurde nur in einer Beckenkammspanprobe mit einer Konzentration von 0,9 pg/g sowie drei RIA-Proben in der mittleren Konzentration von 2,4 pg/g nachgewiesen. In den flüssigen Proben war BMP-2 in sehr geringer Konzentration nachweisbar (PRP: 0,3pg/g; PPP: 0,2 pg/g; Spülflüssigkeit 0,2pg/g).

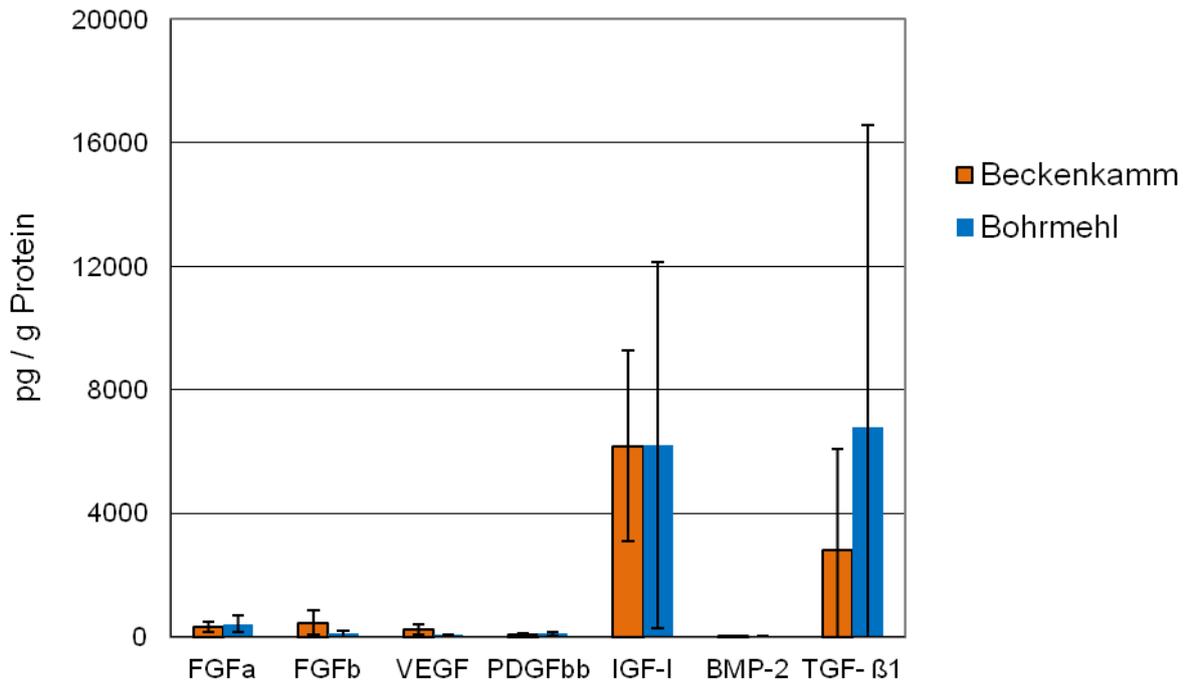


Abbildung 22: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Beckenkammspan und Bohrmehl nach Normalisierung auf Gesamtproteinmenge

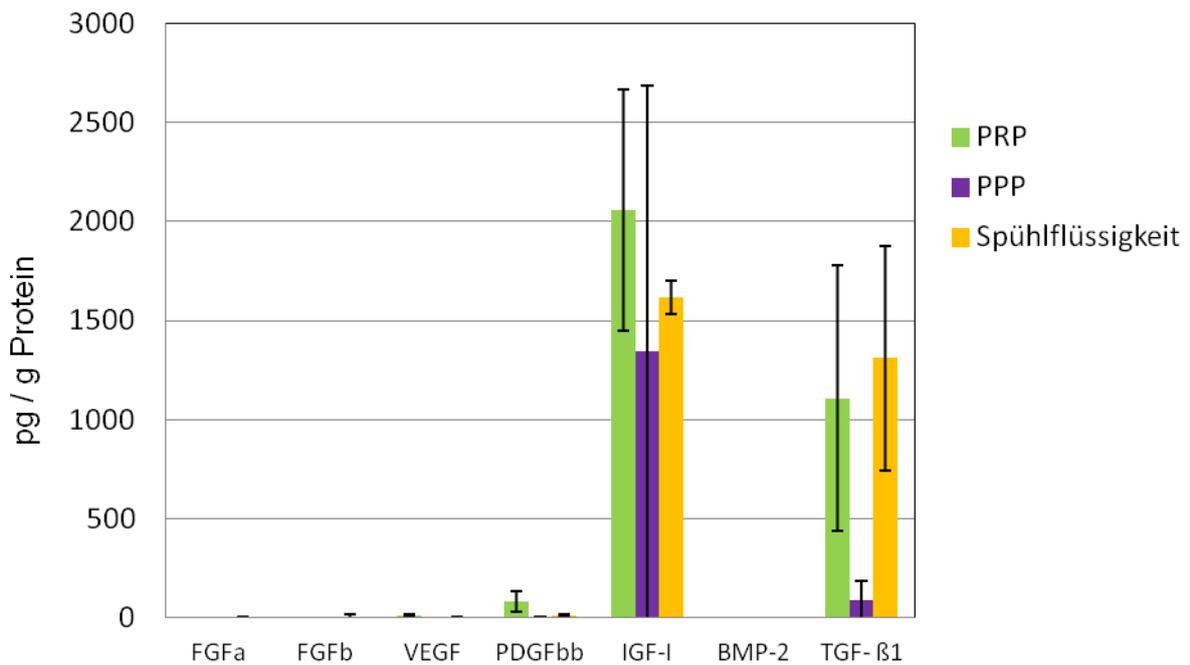


Abbildung 23: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im PRP, PPP und Spülflüssigkeit nach Normalisierung auf Gesamtproteinmenge

## **4. DISKUSSION**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die quantitative Analyse von acht Wachstumsfaktoren in Beckenkammspan, Bohrmehl, der beim Bohrvorgang anfallenden Spülflüssigkeit sowie Platelet Rich Plasma (PRP) und Platelet Poor Plasma (PPP) mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA). Der Vergleich der Konzentrationen dieser Faktoren in den beschriebenen Materialien kann einen ersten Hinweis auf die biologische Potenz der Materialien bei ihrer Verwendung in der Therapie von Knochenheilungsstörungen geben. Von großem Interesse ist hierbei insbesondere der Vergleich zwischen dem bis jetzt als „Goldstandard“ eingesetzten Beckenkammspan und dem durch ein neuartiges „Saug-Spül“ Bohrsystem (RIA) gewonnenen Bohrmehl.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Beckenkammspan und Bohrmehl vergleichbare Mengen an Wachstumsfaktoren gemessen wurden. Auch in der Spülflüssigkeit, die beim Bohrvorgang anfällt konnten Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden, die zum Teil auf vergleichbarem Niveau mit deren Konzentration im PRP lagen.

### **4.1 Diskussion der Ergebnisse**

Vergleicht man die Konzentration der Wachstumsfaktoren in den knöchernen Materialien, so lagen fünf der acht Faktoren (FGFa, PDGF, IGF-I, BMP-2 und TGF- $\beta$ 1) in dem Knochenmehl in einer im Vergleich zum Beckenkammspan erhöhten Konzentration vor. Zwei der Wachstumsfaktoren (FGFb, VEGF) waren im Beckenkammspan signifikant höher konzentriert. Somit kann geschlossen werden, dass in dem Bohrmehl eine zum Beckenkammspan vergleichbare Menge an Wachstumsfaktoren enthalten ist.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit lediglich die Konzentrationen der acht Wachstumsfaktoren bestimmt wurden, nicht aber ihr biologische Aktivität bzw. Osteoinduktivität. Hierfür ist die angewandte Methodik nicht geeignet. Für Wachstumsfaktoren aus der BMP-Gruppe gibt es Studien, in denen ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration und biologischen Aktivität bewiesen wurde. So konnten Honsawek et al. einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von BMP-4 in demineralisierter Knochenmatrix und deren Osteoinduktivität belegen (110). Bae et al. haben in Ihrer 2010 veröffentlichten Studie nicht nur eine hohe Varianz der

Konzentration von BMP-2 und 7 in verschiedenen Chargen einer kommerziell verfügbaren demineralisierten Knochenmatrix aufzeigen können, sondern haben ebenso einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration und deren biologischen Aktivität, gemessen an der spinalen Fusionsrate von Ratten, gesehen (111). Für andere Wachstumsfaktoren wurde dieser Zusammenhang bisher in vivo nicht aufgezeigt. Somit müssen weitere Studien, die die biologische Aktivität, bzw. Osteoinduktivität und die Korrelation zu deren Konzentration analysieren, folgen.

Auch Rückschlüsse auf die klinische Effizienz der untersuchten Materialien können allein anhand der Konzentration der Wachstumsfaktoren nicht geschlossen werden. Hier spielen neben der Wachstumsfaktorkonzentration und ihrer biologischen Aktivität eine Vielzahl weiterer Faktoren, wie zum Beispiel die mechanischen Eigenschaften oder die Oberflächenstruktur und Porosität des Transplantats eine Rolle. Nichtsdestotrotz ist auch das Wissen um die Konzentration dieser Faktoren eine wesentliche Information, die insbesondere für weitere Studien unabdingbar ist.

Einen anderen Ansatz zur Analyse der biologischen Potenz von Beckenkammspan und RIA- Material haben Sagi et al. verfolgt: In ihrer 2012 veröffentlichten Studie haben sie nicht die absoluten Wachstumsfaktorkonzentrationen, sondern die quantitative Expression von Genen, die in der knöchernen Regeneration von Bedeutung sind, untersucht (112). Des Weiteren wurden auch die histologischen Eigenschaften dieser beiden Materialien verglichen. Hierfür wurde zehn Patienten sowohl Beckenkammspan als auch RIA-Proben entnommen. Der histologische Vergleich zeigte in dem RIA Material deutlich kleinere Knochenfragmente und einen höheren Anteil an hämatopoetischen Gewebeanteilen. Die weitere Analyse zeigte in den RIA-Proben eine signifikant erhöhte Anzahl von mesenchymalen Stammzellen sowie eine höhere Expression von BMP-2 und VEGF-Rezeptoren. Durch diese Mehrexpression und dadurch bedingter höherer Rezeptordichte kann eine verstärkte zelluläre Reaktion auf eine entsprechende Stimulation durch diese Wachstumsfaktoren bewirkt werden. Somit schlussfolgern die Autoren, dass das RIA-Material stärkere regenerative Eigenschaften bei der Verwendung als autologes Knochentransplantat verglichen mit Beckenkammspan hat. In der vorliegenden Arbeit wurde im RIA-Material eine dreifach höhere Konzentration von BMP-2 gefunden. Dieser Unterschied war nicht signifikant, könnte aber trotzdem im Zusammenspiel mit der höheren Rezeptordichte einen klinisch messbaren Effekt auf die Knochenregeneration haben.

Bisher liegen nur wenige vergleichende Studien vor, die die Wachstumsfaktorkonzentration in Knochentransplantaten bzw. frischen Knochenersatzmaterialien analysieren. Wildemann et al. haben drei verschiedene, klinisch eingesetzte demineralisierte Knochenmatrizes auf ihren Gehalt an Wachstumsfaktoren hin untersucht (113). Analog zu der vorliegenden Arbeit konnte hier kein BMP-4 nachgewiesen werden. Auch gab es eine erhebliche Varianz innerhalb der einzelnen analysierten Knochenmatrizes sowohl bezüglich der Gesamtproteinmenge, als auch bezüglich der Wachstumsfaktorkonzentrationen. Andere Autoren beschreiben ähnliche Ergebnisse: So haben Bae et al. bei der Analyse von demineralisierter Knochenmatrix auf den Gehalt von BMP -2 und -4 lediglich sehr geringe Mengen dieser Faktoren nachweisen können und des Weiteren eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Proben gesehen, die in negativer Korrelation zum Spenderalter standen (111, 114) Pietrzak et al. haben das Spendergeschlecht als möglichen Einflussfaktor auf die Konzentration von BMP-2, -4 und 7 in demineralisierter Knochenmatrix identifiziert (115). Die Arbeitsgruppe um Li et al. hat drei gefriergetrocknete, allogene demineralisierte Knochenmatrizes auf ihren Gehalt an BMP-2 und -4 untersucht (116). In dieser Studie konnten in keinem der Materialien diese Faktoren nachgewiesen werden. Nach Zugabe von rekombinanten BMP konnte nicht nur dieses mittels der von den Autoren verwendeten Methodik nachgewiesen werden, sondern auch Proteinbruchstücke, die auf das Vorhandensein einer proteolytischen Substanz hinweisen. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Konzentrationen für BMP-2 und -4 sowie ihre Varianz sind somit vergleichbar mit den Ergebnissen in der aktuellen Literatur.

Die in der vorliegenden Studie in höchster Konzentration nachgewiesenen Wachstumsfaktoren waren sowohl in den knöchernen als auch in den flüssigen Proben IGF-1 sowie TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 spielt bei der Frakturheilung insbesondere in der frühen Heilungsphase eine wichtige Rolle, da er die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu osteogenen Zellen bewirkt. Auch IGF-1 fördert die Proliferation von Osteoblasten, fördert aber des Weiteren auch die Synthese von VEGF, welches ebenso in der frühen Frakturheilungsphase für die Angiogenese elementar ist (117). IGF-1 wurde auch durch andere Autoren sowohl im frischen, humanen Femurkortex als auch im Beckenkammspan nachgewiesen. Analog zu dem BMP-2 und 4 zeigt sich auch für die IGF-1 Konzentration in diesen Materialien eine negative Korrelation mit dem Alter (118). Ein Zusammenhang zwischen dieser

Konzentrationsabnahme und einer geringeren Knochenmasse konnte aber nicht bestätigt werden (119). Trotzdem wird eine Relation zwischen der altersbedingten- und postmenopausalen Osteoporose und dem Gehalt an IGF-1 vermutet (120).

Neben der Quantifizierung von Wachstumsfaktoren, ist auch der Nachweis von vitalen, osteoblastären Zellen im Bohrmehl bereits gelungen (10). Frölke et al. haben hierfür Zellen aus Bohrmehl und Beckenkamm kultiviert und die Gesamtproteinmenge, die Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie deren Reaktion auf Vitamin D Substitution verglichen. Sowohl die Proteinmenge, als auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase und deren Reaktion auf die Vitamin D Gabe waren in Zellen beider Materialien vergleichbar, was für die Vitalität der in diesen Materialien enthaltenen osteogenen Zellen spricht. Auch bei Einsatz verschieden großer Bohrer, deren Verwendung mit unterschiedlicher Hitzeentwicklung einhergehen könnte, konnte kein Unterschied in der Aktivität der alkalischen Phosphatase detektiert werden. In einer weiteren Studie untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die osteogene Potenz von Bohrmehl und Beckenkammspan in einem Schafmodell (121). Nach 3 Wochen konnte sowohl in der Beckenkammspangruppe als auch in der Gruppe, in der das Bohrmehl eingesetzt wurde, ein signifikant vermehrtes Kallusvolumen im Vergleich zur Leerprobe nachgewiesen werden. Auch wenn dieser Unterschied nach 6 Wochen nicht mehr nachweisbar war, spricht das Ergebnis doch für die vergleichbare Bioaktivität von Bohrmehl und Beckenkammspan.

Diese Erkenntnisse geben auch einen möglichen Erklärungsansatz für die Beobachtung zahlreicher klinischer Studien, in denen gezeigt wurde, dass durch die intramedulläre Aufbohrung vor Marknagelung eine verbesserte Knochenheilung erzielt werden kann (5, 40). Auf der anderen Seite stehen die möglichen Nachteile der intramedullären Aufbohrung, wie die durch erhöhte intramedullären Drücke verstärkte Fettintrasation und damit erhöhte Gefahr der Fettembolie. Die Motivation diese Komplikationen zu vermeiden führte letztendlich zur Entwicklung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bohrsystems. Dabei handelt es sich um das kommerziell verfügbare RIA-System (Reamer-Irrigator-Aspirator System, Synthes, USA). Bei diesem System wird zur Vermeidung hoher Drücke beim Bohren, ein Unterdruck erzeugt. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass dies zu einer signifikant geringeren Fettintrasation führt (7, 122, 123). Durch die gleichzeitige Spülung wird auch die Hitzeentwicklung, die bei anderen Bohrsystemen

auftreten kann, vermieden und das Knochenmehl aus dem Markraum gespült(9). Die verringerte Temperatur und Druckentwicklung haben möglicherweise einen, im Vergleich zu konventionellen Bohrsystemen, positiven Effekt auf die Zellviabilität und die Stabilität der enthaltenen Wachstumsfaktorkonzentrationen.

Das auf diese Art und Weise gewonnene Bohrmehl könnte also eine Alternative zu dem bisher als Goldstandard geltenden Beckenkammspan dienen. Das Material hat eine vergleichbare Menge an Wachstumsfaktoren und enthält osteoblastäre Zellen. Zusätzlich ist die Entnahmemorbidity im Vergleich zur Beckenkammspanentnahme geringer. Jedoch werden auch für diese neuartige Methode der Autograftgewinnung in der neusten Literatur Komplikationen beschrieben.

Dimitriou et al. haben in einer Metaanalyse systematisch die Häufigkeit und Art der Komplikationen nach RIA-Anwendung und Beckenkammspanentnahme untersucht. In der Zeitspanne von Januar 1990 bis Oktober 2010 wurden insgesamt 92 Studien mit 6682 Patienten in die Analyse mit einbezogen. Davon bezogen sich 12 Studien mit 233 Patienten auf das RIA-Verfahren, mit der ersten Publikation aus dem Jahr 2007. Für dieses Patientenkollektiv wurde eine Gesamt-Komplikationsrate von 6% (14 Patienten) ermittelt. Lowe et al. berichten über sechs RIA-assoziierte Komplikationen in einer multizentrischen Studie mit insgesamt 97 durchgeführten RIA-Prozeduren: in vier Fällen war es zu einer Fraktur am Entnahmeknochen gekommen, in zwei weiteren Fällen kam es zu kortikalen Defekten am Entnahmeknochen, die eine prophylaktische, intramedulläre Stabilisierung notwendig machten (124). Quintero et al. beschreiben einen Fall einer exzentrischen Bohrung, wobei der anteriore Femurkortex zwar ausgedünnt aber der Kortex keine Diskontinuität zeigte. In diesem Fall wurde auf eine prophylaktische Osteosynthese verzichtet. Bei einem zweiten Patienten kam es zur Penetration des Führungsdrahtes durch den lateralen Femurkondylus in das Kniegelenk. Bei keinem dieser Patienten kam es postoperativ zu persistierenden Beschwerden (125). Belthur et al. berichten über einen Fall in dem es durch ein fehlerhaftes Einbringen des Führungsdrahtes zu einer Verletzung des lateralen Schenkelhalses gekommen ist. Hier wurde der Schenkelhals protektiv mit drei kanülierten Schrauben stabilisiert (126). Weitere beschriebene Komplikationen waren heterotope Ossifikationen im Bereich des Zugangsweges sowie eine hypertrophe Narbe (127).

In einer biomechanischen Kadaverstudie wurde ebenso in zwei von 19 Fällen über eine geringere biomechanische Belastbarkeit im Bereich der aufgebohrten Femura

berichtet (128). Neben dem exzentrischen Bohren wird in dieser Studie auch das Aufbohren mit einem zu großen Bohrer und somit eine zu starke Ausdünnung des Kortex als mögliche Ursache postuliert.

In der zuvor bereits erwähnten Metaanalyse von Dimitriou wurde für die Beckenkammspanentnahme eine Komplikationsrate von 19,37% ermittelt, was 1249 Komplikationen in 6449 Patienten entspricht. Die häufigsten Komplikationen waren hierbei persistierende Schmerzen im Entnahmbereich in 7,75% der Patienten (500 Fälle), Infektionen (91 Fälle) und postoperative Hämatome bei 96 Patienten. In dem gesamten Patientenkollektiv kam es zu 13 Frakturen im Bereich des Beckenkamms, die jedoch bis auf einen Fall konservativ behandelt wurden. Iatrogene Nervenverletzungen wurden in insgesamt 64 Patienten beobachtet, wobei hiervon in 20 Fällen die clunalen Nerven und in 44 Fällen der Nervus cutaneus femoris betroffen waren. Häufige Beschwerden waren auch Dysästhesien im Narbenbereich in 4,81% der Fälle (310 Patienten) oder auch Wundheilungsstörungen bei 1,49% der Fälle.

Bezüglich der persistierenden Schmerzsymptomatik berichten andere Studien über eine deutlich höhere Inzidenz. So beobachteten Sasso et al. sechs Monate nach Beckenkammspanentnahme noch bei 41% der Patienten Schmerzen. Auch zum finalen Nachuntersuchungszeitpunkt nach 24 Monaten gaben noch 31% der Patienten Schmerzen an, deren Intensität aber deutlich regredient war (129). Bezüglich der Entnahmemorbidität scheint also nach aktueller Studienlage das RIA-Verfahren der Beckenkammspanentnahme überlegen zu sein.

Ein weiterer Vorteil des RIA-Verfahrens gegenüber der Beckenkammspanentnahme ist die Möglichkeit größere Mengen Material zu gewinnen. Die Menge des am Beckenkamm zu entnehmenden Material beträgt, in Abhängigkeit von der Lokalisation zwischen 12 und 30 cm<sup>3</sup>, einzelne Autoren berichten auch von bis zu 50 cm<sup>3</sup> (36, 39). Dahingegen berichten verschiedene Autoren über ein Entnahmevolumen zwischen 40 und 90 cm<sup>3</sup> durch das RIA-Verfahren (126, 127, 130). Hohe Graft Volumina werden insbesondere bei Pseudarthrosen-Revisionen der langen Röhrenknochen aber auch bei z.B. Arthrodeese der unteren Extremität benötigt. Die Möglichkeit höhere Volumina zu gewinnen ist also ein wesentlicher Vorteil des RIA-Systems.

Die Praktikabilität und Wirksamkeit des RIA-Systems konnte auch im klinischen Setting bestätigt werden. Kanakaridis et al. berichten über eine Kohorte von 41

Patienten die mittels des RIA-Systems operativ versorgt wurden. Die Indikationen waren hierbei zum einen polytraumatisierte Patienten mit Tibiaschaftfrakturen, bei denen das RIA-System vor Marknagelung eingesetzt wurde. Des Weiteren wurde das RIA-System bei Patienten mit einer Osteomyelitis des Femurs zur Markraumspülung eingesetzt, bei Patienten mit Pseudarthrosen wurde Autograft für die Pseudarthrosenrevision gewonnen und schließlich wurde bei Patienten mit pathologischen Prozessen im Bereich des Femurs eine prophylaktische Marknagelung mit vorheriger Markraumaufbohrung mittels RIA durchgeführt. Auch in diesem Setting war die Komplikationsrate gering und das Graft-Volumen groß. Kanakaris berichtet über zwei postoperative Hämatome, die im Verlauf ohne weitere Intervention abklangen. Des Weiteren kam es zu einer intraoperativen Diskonnektion des Bohrkopfes, die der Autor auf eine fehlerhafte Vorbereitung des Bohrkopfes zurückführte. Nichtsdestotrotz bestätigte Kanakaris die Ergebnisse bezüglich des Graft-Volumens und der Komplikationsrate und schlussfolgert, dass das RIA-System in all den beschriebenen Indikationen ein gut toleriertes und mit wenig Komplikationen behaftetes Verfahren ist (131).

Während die beschriebenen potentiellen Komplikationen sowie das teilweise eingeschränkte Graft-Volumen spezifische Nachteile der autologen Knochentransplantate sind, so ist ein wesentlicher Vorteil sowohl der autologen Knochentransplantate als auch des Platelet Rich Plasmas das Vorhandensein mehrerer Wachstumsfaktoren, die eine z.T. synergistische Wirkung haben und zu verschiedenen Zeitpunkten in den Heilungsprozess eingreifen. Insbesondere das Zusammenspiel von osteoinduktiven und angiogenen Faktoren scheint hierbei von wesentlicher Bedeutung zu sein. Dies spiegelt sich auch in der zeitlichen Abfolge der physiologischen Wachstumsfaktorexpression während der Knochenheilung wider: So spielen BMP-2, PDGF und TGF- $\beta$ 1 eine wichtige Rolle in der inflammatorischen Phase der Frakturheilung und somit in der Einleitung der Frakturheilungskaskade. Tierexperimentelle Studien zeigen eine maximale BMP-2 mRNA Expression innerhalb von 24 Stunden nach Fraktur. Auch PDGF und TGF- $\beta$ 1 liegen unmittelbar nach der Fraktur in höchster Konzentration vor, nachdem sie aus degranulierenden Thrombozyten abgegeben wurden (132). Zur Nutrition des so entstandenen Kallusgewebes ist dann die Neovaskulierung unabdingbar, die unter anderen durch VEGF stimuliert wird. BMP-4 wiederum führt durch Rekrutierung von Osteoblasten zur „Reifung“ und Ossifikation des knorpeligen Kallus (133). Insbesondere die

Interaktion der verschiedenen Wachstumsfaktoren untereinander sowie mit anderen Cytokinen ist weiterhin Gegenstand einer Vielzahl von Studien. Die Komplexität dieser Prozesse unterstreicht die Annahme, dass die bloße Analyse der Wachstumsfaktorkonzentrationen zum Zeitpunkt Null nur eine grobe Abschätzung der biologischen Potenz eines Materials ermöglicht.

Seit einiger Zeit werden Einzelsubstanzen klinisch eingesetzt. So ist BMP-7 seit 2001 in Deutschland zur Behandlung von Pseudarthrosen der Tibia sowie zur Applikation bei spinalen Fusionen zugelassen (134). Auch rekombinantes BMP-2 ist zur Anwendung bei frischen Tibiaschaftfrakturen und monosegmentalen anterioren lumbalen Spondylodese seit 2005 zugelassen. Die aktuelle Studienlage hinsichtlich der klinischen Effektivität dieser Faktoren ist allerdings zum aktuellen Zeitpunkt unzureichend und eine Reevaluation der bisher publizierten Daten sowie der Daten der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) zeigen ein erhebliches Komplikationspotential. So berichten Carragee et al. in ihrer Analyse über eine bis zu 40% erhöhte Komplikationsrate nach Applikation von rekombinanten BMP-2 im Rahmen von dorsalen und ventralen spinalen Fusionen. Diese Komplikationen beinhalteten Infektionen, Implantatmigration, heterotope Ossifikationen und ein insgesamt herabgesetztes funktionelles Outcome. Die im Rahmen dieser Analyse beschriebenen Komplikationsraten sind um ein 10 bis 50-faches höher als in den Primärveröffentlichungen (135). Garrison et al. schlussfolgern in Ihrer Metaanalyse, dass eine Vielzahl der vorliegenden Studien ein unzureichendes Studiendesign aufweisen und eventuelle Interessenkonflikte bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Durch Studien belegt scheint lediglich die Effektivität bei Applikation von BMP in der Therapie der akuten Tibiafrakturen, wohingegen ein Vorteil beim Einsatz in der Therapie von Tibiapseudarthrosen bisher nicht sicher belegt ist (82).

Neben der Wachstumsfaktorkonzentration in Beckenkammspan und Bohrmehl wurde ebenso die durch das Bohrsystem gewonnene Spülflüssigkeit analysiert. Um die Konzentration der Wachstumsfaktoren in der Spülflüssigkeit mit einer anderen flüssigen Probe in Bezug zu setzen, wurde als Vergleichsmaterial das Platelet Rich- sowie Poor Plasma analysiert. PRP wird als potentielle Quelle von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren häufig in Kombination mit allogenen oder autologen Knochentransplantaten eingesetzt. Sowohl FGFa als auch FGFb waren in der Spülflüssigkeit in signifikant höherer Konzentration nachweisbar, wobei FGFa in PRP

überhaupt nicht nachweisbar war. Die Konzentration der anderen Faktoren war im PRP höher, mit einem signifikanten Unterschied der Konzentration von PDGF und VEGF. Aus diesem Grunde sind diese Ergebnisse vielversprechend, könnte doch durch entsprechende Aufarbeitung der in hohen Volumen verfügbaren Spülflüssigkeit, eine vergleichbare oder sogar höhere Wachstumsfaktorkonzentration im Vergleich zum PRP erzielt werden.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war der Vergleich der Wachstumsfaktorkonzentration im Platelet Rich Plasma im Vergleich zu dem Platelet Poor Plasma. Hierbei war die Konzentration von VEGF nach der Anreicherung um das 53fache des Ausgangswertes erhöht. Auch die Konzentrationen von PDGF mit einer 23fachen Steigerung, die von TGF- $\beta$ 1 mit einer 14fachen und BMP-2 mit einer 2fachen Steigerung waren im Vergleich zu PPP deutlich erhöht. Die Konzentration von IGF-1 war hingegen nach Anreicherung nahezu unverändert. Eppley et al. haben in ihrer Studie bei Verwendung des gleichen Aufarbeitungssystems vergleichbare Ergebnisse erzielen können (136). Auch sie beobachteten einen Konzentrationsanstieg von VEGF, PDGF und TGF- $\beta$ 1, während die Konzentration des IGF-1 unverändert blieb. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurden hier allerdings die Konzentrationen zwischen Vollblut und PRP verglichen. In einer weiteren Studie von Marx wurde PRP auf den Gehalt an PDGFab und TGF- $\beta$ 1 untersucht (68). Hierbei wurden zwei verschiedene Extraktionssysteme angewandt. Der Gehalt an TGF- $\beta$ 1 war bei beiden Methoden vergleichbar und lag zwischen 144 und 170 ng/ml in der gleichen Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit (107 ng/ml). Ein Vergleich der Daten bezüglich der PDGF-Konzentration ist obsolet, da hier eine andere Isoform des Wachstumsfaktors bestimmt wurde (PDGFab).

Während zahlreiche Studien über die erhöhten Wachstumsfaktorkonzentration im PRP berichten, ist die klinische Effizienz dieses Materials zur Verbesserung der Knochenheilung nicht sicher belegt (137). Platelet Rich Plasma wurde nach zunächst vielversprechenden Ergebnissen in der Therapie von mandibulären Knochendefekten in Kombination mit autologen Graftmaterial eingesetzt. So berichten Marx et al. über signifikant erhöhte Knochendichte bei Verwendung von PRP und autologer Beckenkammpongiosa im Vergleich zur alleinigen Verwendung des Beckenkamm-Materials (52). Andere Autoren konnten diese Ergebnisse aber nicht mit eigenen experimentellen Daten belegen. Auch Mooren et al. habe durch Zugabe von PRP zu autologen Knochentransplantat keinen signifikanten Unterschied

bezüglich der Knochenheilung von „Critical-Size“-Defekten an Schaf-Schädeln nachweisen können (138). Dahingegen berichten andere Autoren von einem positiven Effekt durch Zugabe von PRP, insbesondere in Kombination mit synthetischen, osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien. So konnten Kasten et al. durch Applikation von PRP in Kombination mit einem Hydroxylapatit-Graft zur Therapie von Knochendefekten an Kaninchen-Tibiae eine signifikant höheres Kallusvolumen als durch alleinige Anwendung des Hydroxylapatit-Grafts erzielen (139). Ob durch die Applikation von RIA-Spülflüssigkeit, die eine vergleichbare Wachstumsfaktorkonzentration hat, ein ähnlicher, positiver Effekt erzielt werden kann, sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

#### **4.2 Diskussion der Methodik**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt der Wachstumsfaktoren IGF-1, BMP-2, BMP-4, FGFa, FGFb, PDGF, TGF- $\beta$ 1 sowie VEGF, mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) bestimmt. Für die Tests wurden ausschließlich kommerziell verfügbare Kits verwendet, die hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität etabliert sind.

Vor der Quantifizierung mittels ELISA mussten die Materialien in unterschiedlicher Art und Weise aufgearbeitet werden. Die Beckenkammspanproben waren sehr inhomogen und beinhalteten spongiöse sowie kortikale Anteile. Aus diesem Grunde wurden diese Proben mittels einer Kugelmühle zerkleinert. Aufgrund des Bohrvorgangs waren die Knochenmehlproben schon homogen, allerdings noch sehr grob strukturiert, weshalb diese mittels eines Dispergiergerätes weiter zerkleinert wurden. Die Platelet Rich Plasma Proben wurden nach erfolgter Zentrifugation „gepottert“, d.h. die Thrombozyten wurden mechanisch zerstört, so dass die in ihnen enthaltenen Wachstumsfaktoren liberiert wurden. Es kann keine sichere Aussage getroffen werden, inwiefern die in dieser Arbeit verwendeten, unterschiedlichen mechanischen Aufarbeitungsmethoden Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben. Gleiches gilt aber auch für die in-vivo Situation, in der Materialeigenschaften wie Viskosität, Dichte und Struktur die Kinetik der Wachstumsfaktorliberation beeinflussen können, wobei auch hier der tatsächliche Einfluss dieser Materialeigenschaften noch nicht untersucht wurde. Die gewählte Vorbearbeitung der einzelnen Proben wurde somit an deren strukturellen Eigenschaften angepasst.

Möglicherweise unterscheiden sich die mit dieser Methodik ermittelten Ergebnisse von den in-vivo vorhandenen Konzentrationen. Inwiefern es hier Unterschiede gibt und ob diese einen Einfluss auf die Frakturheilung haben, sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

Für die Extraktion der Proteine aus den knöchernen Materialien wurde ein PBS Puffer mit Proteinase Inhibitor verwendet. Dieses Verfahren ist einfach und schnell durchführbar. Im Vergleich zu anderen Verfahren ist insbesondere der Zeitaufwand deutlich geringer. Dieser beträgt z.B. für die Proteinextraktion in dem Kollagenase-Verdau Verfahren durch zweimalige Übernacht-Inkubation bis zu 48 Stunden. Das Guanidine HCL/EDTA-Verfahren erfordert eine einmalige 24 stündliche Inkubation, wohingegen für die PBS/Proteinase-Methodik lediglich eine einmalige Inkubation für 2 Stunden erforderlich ist. Zur Evaluation der Effizienz dieses Verfahrens wurde in einer Vorstudie diese Methodik mit den zwei eben genannten verglichen (113). Hier zeigten die drei Verfahren zwar einerseits deutliche Unterschiede in der absoluten extrahierten Proteinmenge, die Verhältnisse der Faktorenkonzentrationen waren aber in jeder der untersuchten Methodiken vergleichbar. Da alle Proben in der vorliegenden Studie mittels der gleichen Methodik analysiert wurden, war eine Vergleichbarkeit der erzielten Werte möglich. Bei einem direkten Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Studien muss aber die Art der Proteinextraktion unbedingt hinterfragt und bei der Interpretation berücksichtigt werden. Interessanterweise war in einer Vorstudie BMP-4 mittels der Proteinase Extraktion nachweisbar (113). Warum dieser Faktor in der vorliegenden Arbeit in keinem der analysierten Materialien nachweisbar war ist nicht sicher eruierbar. Mögliche Gründe hierfür sind u.a. eine BMP-4 Konzentration die unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Kit von 1 pg/ml Material lag. Des Weiteren könnte sich das Extraktionsverhalten der in dieser Studie analysierten Materialien von dem Extraktionsverhalten der in der Vorstudie analysierten demineralisierten Knochenmatrix unterscheiden. Zusätzlich könnten interindividuelle Varianzen und die Vorbehandlung der analysierten Proben Einfluss auf die bestimmte Wachstumsfaktorkonzentration darstellen: Kalén et al. haben in einer Analyse der BMP-2 und -4 Konzentration im PRP mittels einer ähnlichen Methodik eine große Varianz zwischen den einzelnen Spendern aufzeigen können. Sie haben des Weiteren einen Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem PH-Wert der analysierten Probe gefunden: Proben mit einem pH von 4.3 wiesen signifikant

höhere BMP-2 und -4 Konzentrationen auf, als die Proben mit einem neutralen pH von 7.3 (140). In der vorliegenden Arbeit wurde der pH-Wert in den verschiedenen Materialien nicht bestimmt. Zukünftige Studien sollten diese beschriebenen Einflussgrößen berücksichtigen, um eine entsprechende Wertung der Ergebnisse zu erleichtern.

In allen Proben wurde die Gesamtproteinmenge mittels eines Coomassie-Bradford-Tests bestimmt, so dass die ELISA Ergebnisse auf die Gesamtproteinmenge normalisiert werden konnten.

Die Normalisierung der Wachstumsfaktorkonzentrationen auf die Gesamtproteinmenge erfolgte, da der Gesamtproteingehalt in den analysierten Proben eine hohe Varianz aufwies. Um den potentiellen Einfluss dieser interindividuellen Schwankungen auf die ermittelten Wachstumsfaktorkonzentrationen zu eliminieren, wurden diese auf die jeweilige Gesamtproteinkonzentration normalisiert. Vergleicht man die Ergebnisse der Wachstumsfaktorkonzentrationen nach Normalisierung auf das Probengewicht, bzw.-volumen mit denen nach Normalisierung auf die Proteinmenge, so zeigen sich hier vergleichbare Ergebnisse: Die Verhältnisse der Konzentrationen zueinander innerhalb eines Materials sowie zwischen den verschiedenen Proben sind mit beiden Normalisierungsmethoden weitestgehend vergleichbar. In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der besseren Anschaulichkeit bei vergleichbaren Ergebnissen die Entscheidung zugunsten der Normalisierung auf Probengewicht/-volumen getroffen. Die analysierten RIA-, Beckenkamm- und Blutproben stammen von unterschiedlichen Individuen. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse als mögliche Ursache für eine Varianz der Konzentrationen zu berücksichtigen. In der Literatur werden insbesondere für die Konzentration von BMP-2 und -4 eine hohe interindividuelle Streuung beschrieben (140). Sagi et al. haben in Ihrer Studie die für die Knochenheilung relevante Genexpression in Beckenkammspan und RIA-Proben des gleichen Patienten untersucht und konnten somit diese Problematik umgehen (112). Das zusätzliche operative Risiko, ohne unmittelbaren Nutzen für den Patienten, erlaubte aus ethischen Gründen dieses Vorgehen in der vorliegenden Studie nicht.

### **4.3 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals vergleichbare Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in Beckenkammspan und intramedullären Bohrmehlaspirat nachgewiesen werden. Auch in der bei dem Bohrvorgang anfallenden Spülflüssigkeit waren Wachstumsfaktoren vorhanden, deren Konzentration zum Teil auf dem Niveau des Platelet Rich Plasmas lagen. Die so gewonnenen Materialien könnten also eine mögliche Alternative zu den bisher verwendeten autologen Knochentransplantaten sein. Hierfür sprechen neben den vorliegenden Ergebnissen insbesondere die in ersten klinischen Studien belegte geringere Entnahmemorbidität, die Möglichkeit hohe Graft-Volumina zu entnehmen und gute klinische Ergebnisse.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Guichet JM, Spivak JM, Trouilloud P, Grammont PM. Lower limb-length discrepancy. An epidemiologic study. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 Nov;272(272):235-41.
2. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S75-80.
3. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Aug;329(329):300-9.
4. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, et al. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine.* 2003 Jan 15;28(2):134-9.
5. Bhandari M, Guyatt GH, Tong D, Adili A, Shaughnessy SG. Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: a systematic overview and meta-analysis. *J Orthop Trauma.* 2000 Jan;14(1):2-9.
6. Bhandari M, Guyatt G, Tornetta P, 3rd, Schemitsch EH, Swiontkowski M, Sanders D, et al. Randomized trial of reamed and unreamed intramedullary nailing of tibial shaft fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Dec;90(12):2567-78.
7. Volgas DA, Burch T, Stannard JP, Ellis T, Bilotta J, Alonso JE. Fat embolus in femur fractures: a comparison of two reaming systems. *Injury.* 2010 Nov;41S2:S90-S3.
8. Sturmer KM. Measurement of intramedullary pressure in an animal experiment and propositions to reduce the pressure increase. *Injury.* 1993;24 Suppl 3:S7-21.
9. Higgins TF, Casey V, Bachus K. Cortical heat generation using an irrigating/aspirating single-pass reaming vs conventional stepwise reaming. *J Orthop Trauma.* 2007 Mar;21(3):192-7.
10. Frolke JP, Nulend JK, Semeins CM, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Viable osteoblastic potential of cortical reamings from intramedullary nailing. *J Orthop Res.* 2004 Nov;22(6):1271-5.
11. Wensch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Herde K, Heiss C, et al. Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone.* 2005 Jan;36(1):74-83.
12. Bibbo C, Bono CM, Lin SS. Union rates using autologous platelet concentrate alone and with bone graft in high-risk foot and ankle surgery patients. *J Surg Orthop Adv.* 2005 Spring;14(1):17-22.

13. Al-Sukhun J, Helenius M, Lindqvist C, Thoren H. Use of platelet rich plasma (PRP) in the reconstruction of mandibular bony defects: Clinical and radiographic follow-up. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Jan 6;6:6.
14. Griffin XL, Wallace D, Parsons N, Costa ML. Platelet rich therapies for long bone healing in adults. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2012;7:CD009496.
15. Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury*. 2006 Aug;37(8):691-7.
16. Court-Brown CM, McBirnie J. The epidemiology of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br*. 1995 May;77(3):417-21.
17. Harley BJ, Beaupre LA, Jones CA, Dulai SK, Weber DW. The effect of time to definitive treatment on the rate of nonunion and infection in open fractures. *J Orthop Trauma*. 2002 Aug;16(7):484-90.
18. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*. 1978 May;60-B(2):150-62.
19. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*. 1989 Nov(248):283-93.
20. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;355(355 Suppl):S7-21.
21. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec*. 1990 Apr;226(4):414-22.
22. Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009 Apr;98(4):1317-75.
23. Schweiberer L, Baumgart R, Deiler S. [The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance]. *Chirurg*. 1999 Nov;70(11):1193-201.
24. Frolke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury*. 2007 May;38 Suppl 2:S19-22.
25. Ruter A, Mayr E. [Pseudarthrosis]. *Chirurg*. 1999 Nov;70(11):1239-45.
26. Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 1987 Jun;69(5):786-90.

27. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg.* 1996 Sep-Oct;35(5):413-7.
28. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2(2):S96-101.
29. Urist MR. Bone transplants and implants. Urist MR, editor. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 1980.
30. Urist MR, Mikulski AJ. A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY).* 1979 Oct;162(1):48-53.
31. Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;355(355 Suppl):S267-73.
32. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965 Nov 12;150(698):893-9.
33. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* 2005 Nov;16(6):981-9.
34. Tessier P, Kawamoto H, Matthews D, Posnick J, Raulo Y, Tulasne JF, et al. Autogenous bone grafts and bone substitutes--tools and techniques: I. A 20,000-case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2005 Oct;116(5 Suppl):6S-24S; discussion 92S-4S.
35. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976).* 1995 May 1;20(9):1055-60.
36. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 May;84-A(5):716-20.
37. Heneghan HM, McCabe JP. Use of autologous bone graft in anterior cervical decompression: morbidity & quality of life analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009;10:158.
38. Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, Loffler T, Rubenbauer B, Trentzsch H, et al. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *J Trauma Manag Outcomes.* 2009;3:11.

39. Kessler P, Thorwarth M, Bloch-Birkholz A, Nkenke E, Neukam FW. Harvesting of bone from the iliac crest--comparison of the anterior and posterior sites. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Feb;43(1):51-6.
40. Court-Brown CM, Will E, Christie J, McQueen MM. Reamed or unreamed nailing for closed tibial fractures. A prospective study in Tscherne C1 fractures. *J Bone Joint Surg Br*. 1996 Jul;78(4):580-3.
41. Chapman MW. The effect of reamed and nonreamed intramedullary nailing on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;355(355 Suppl):S230-8.
42. Danckwardt-Lilliestrom G. Reaming of the medullary cavity and its effect on diaphyseal bone. A fluorochromic, microangiographic and histologic study on the rabbit tibia and dog femur. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1969;128:1-153.
43. Danckwardt-Lilliestrom G, Lorenzi GL, Olerud S. Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1970;134:1-78.
44. Joist A, Schult M, Frerichmann U, Frebel T, Spiegel HU, Koppe M, et al. [A new irrigation-suction boring system facilitates low-pressure intramedullary boring of isolated swine femurs]. *Unfallchirurg*. 2003 Oct;106(10):874-80.
45. Sharif PS, Abdollahi M. The role of platelets in bone remodeling. *Inflammation & allergy drug targets*. 2010 Dec;9(5):393-9.
46. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
47. Woodell-May JE, Ridderman DN, Swift MJ, Higgins J. Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg*. 2005 Sep;16(5):749-56; discussion 57-9.
48. Christensen K, Vang S, Brady C, Isler J, Allen K, Anderson J, et al. Autologous platelet gel: an in vitro analysis of platelet-rich plasma using multiple cycles. *J Extra Corpor Technol*. 2006 Sep;38(3):249-53.
49. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):233-9.
50. Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, Schonberger JP, Box HA, van Zundert A, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors*. 2006 Sep;24(3):165-71.

51. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009 Nov;37(11):2259-72.
52. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
53. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774-8.
54. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007 Feb;35(2):245-51.
55. Hartmann EK, Heintel T, Morrison RH, Weckbach A. Influence of platelet-rich plasma on the anterior fusion in spinal injuries: a qualitative and quantitative analysis using computer tomography. *Arch Orthop Trauma Surg.* Jul;130(7):909-14.
56. Savarino L, Cenni E, Tarabusi C, Dallari D, Stagni C, Cenacchi A, et al. Evaluation of bone healing enhancement by lyophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Feb;76(2):364-72.
57. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone.* 2007 Feb;40(2):522-8.
58. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma.* 2008 Jul;22(6):432-8.
59. Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 Oct;355(355 Suppl):S294-300.
60. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):2195-207.
61. Ozkan K, Eralp L, Kocaoglu M, Ahishali B, Bilgic B, Mutlu Z, et al. The effect of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the regenerate bone in distraction osteogenesis. *Growth Factors.* 2007 Apr;25(2):101-7.
62. Klar RM, Duarte R, Dix-Peek T, Ripamonti U. The induction of bone formation by the recombinant human transforming growth factor-beta3. *Biomaterials.* 2014 Mar;35(9):2773-88.

63. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol.* 1999 Oct;277(4 Pt 1):C628-37.
64. Beck LS, Amento EP, Xu Y, Deguzman L, Lee WP, Nguyen T, et al. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res.* 1993 Jun;8(6):753-61.
65. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002 Apr 1;7:d793-807.
66. Fedulov AV, Ses TP, Gavrishcheva NA, Rybakova MG, Vassilyeva JG, Tkachenko SB, et al. Serum TGF-beta 1 and TNF-alpha levels and cardiac fibrosis in experimental chronic renal failure. *Immunol Invest.* 2005;34(2):143-52.
67. Nussler AK, Wildemann B, Freude T, Litzka C, Soldo P, Friess H, et al. Chronic CCl intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis. *Archives of toxicology.* 2014 Jan 1.
68. Ehnert S, Baur J, Schmitt A, Neumaier M, Lucke M, Dooley S, et al. TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One.* 5(11):e14073.
69. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury.* 2011 Aug;42(8):833-7.
70. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *Journal of dental research.* 1971 Nov-Dec;50(6):1392-406.
71. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.
72. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res.* 1999 Mar;17(2):269-78.
73. Akeel S, El-Awady A, Hussein K, El-Refaey M, Elsalanty M, Sharawy M, et al. Recombinant bone morphogenetic protein-2 induces up-regulation of vascular endothelial growth factor and interleukin 6 in human pre-osteoblasts: Role of reactive oxygen species. *Archives of oral biology.* 2011 Oct 29.
74. Pecina M, Vukicevic S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. *Int Orthop.* 2007 Dec;31(6):719-20.

75. Wildemann B, Lange K, Strobel C, Fassbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury*. Dec 4.
76. Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CX, Woodruff MA, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*. 2009 May;30(13):2479-88.
77. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Aug;85-A(8):1425-35.
78. McKee MD SE, Waddell JP, editor. The effect of human recombinant bone morphogenetic protein (RHBMP-7) on the healing of open tibial shaft fractures: results of a multi-center, prospective, randomized clinical trial. Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association; 2002 Oct 11–13; Toronto Ontario, Canada.
79. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S151-8.
80. Johnsson R, Stromqvist B, Aspenberg P. Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002 Dec 1;27(23):2654-61.
81. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN, et al. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Sep 1;29(17):1885-92.
82. Garrison KR, Shemilt I, Donell S, Ryder JJ, Mugford M, Harvey I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2010(6):CD006950.
83. Benglis D, Wang MY, Levi AD. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery*. 2008 May;62(5 Suppl 2):ONS423-31; discussion ONS31.
84. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Dec;84-A(12):2123-34.

85. Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S83-90.
86. Daughaday WH. Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol*. 2000 Jul;14(7):537-40.
87. Spencer EM, Liu CC, Si EC, Howard GA. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*. 1991;12(1):21-6.
88. Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int*. 1993 Aug;53(2):97-102.
89. Nakasaki M, Yoshioka K, Miyamoto Y, Sasaki T, Yoshikawa H, Itoh K. IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone*. 2008 Nov;43(5):869-79.
90. Schmidmaier G, Wildemann B, Gabelein T, Heeger J, Kandziora F, Haas NP, et al. Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1. *Acta Orthop Scand*. 2003 Oct;74(5):604-10.
91. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2002 Jun;84-A(6):1032-44.
92. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *Journal of biochemistry*. 2011 Feb;149(2):121-30.
93. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW. Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res*. 1999 Jul;17(4):607-14.
94. Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res*. 1998 Nov;16(6):654-9.
95. Kawaguchi H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Matsushita T, Nakamura T, et al. Local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone repair: A dose-escalation prospective trial on patients with osteotomy. *J Orthop Res*. 2007 Jan 4;4:4.
96. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, et al. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. Dec;25(12):2459-67.

97. Fujii H, Kitazawa R, Maeda S, Mizuno K, Kitazawa S. Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Biol.* 1999 Aug;112(2):131-8.
98. Mehrotra M, Krane SM, Walters K, Pilbeam C. Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 2004 Nov 1;93(4):741-52.
99. Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem.* 2002;87(3):305-12.
100. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316.
101. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994 Mar-Apr;15(2):203-8.
102. Al-Zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, Parsons JR, Bradica G, Hart CE, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor BB (rhPDGF-BB) and beta-tricalcium phosphate/collagen matrix enhance fracture healing in a diabetic rat model. *J Orthop Res.* 2009 Aug;27(8):1074-81.
103. Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem.* 1991 Nov;47(3):219-23.
104. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Sep;378(378):224-37.
105. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone.* 2002 Mar;30(3):472-7.
106. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury.* 2008 Sep;39 Suppl 2:S45-57.
107. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):9656-61.
108. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008 Nov;43(5):931-40.

109. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 May 7;72:248-54.
110. Honsawek S, Powers RM, Wolfinbarger L. Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model. *Cell Tissue Bank*. 2005;6(1):13-23.
111. Bae H, Zhao L, Zhu D, Kanim LE, Wang JC, Delamarter RB. Variability across ten production lots of a single demineralized bone matrix product. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Feb;92(2):427-35.
112. Sagi HC, Young ML, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Tornetta P. Qualitative and quantitative differences between bone graft obtained from the medullary canal (with a Reamer/Irrigator/Aspirator) and the iliac crest of the same patient. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Dec 5;94(23):2128-35.
113. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(2):107-14.
114. Bae HW, Zhao L, Kanim LE, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 May 20;31(12):1299-306; discussion 307-8.
115. Pietrzak WS, Woodell-May J, McDonald N. Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg*. 2006 Jan;17(1):84-90.
116. Li H, Pujic Z, Xiao Y, Bartold PM. Identification of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in commercial demineralized freeze-dried bone allograft preparations: pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2000;2(2):110-7.
117. Kwon YW, Kwon KS, Moon HE, Park JA, Choi KS, Kim YS, et al. Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line HaCaT. *The Journal of investigative dermatology*. 2004 Jul;123(1):152-8.
118. Boonen S, Aerssens J, Dequeker J, Nicholson P, Cheng X, Lowet G, et al. Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I: potential implications for age-related (type II) osteoporotic fracture occurrence. *Calcif Tissue Int*. 1997 Sep;61(3):173-8.
119. Seck T, Bretz A, Krempien R, Krempien B, Ziegler R, Pfeilschifter J. Age-related changes in insulin-like growth factor I and II in human femoral cortical bone: lack of correlation with bone mass. *Bone*. 1999 Apr;24(4):387-93.

120. Pepene CE, Seck T, Diel I, Minne HW, Ziegler R, Pfeilschifter J. Concentration of insulin-like growth factor (IGF)-I in iliac crest bone matrix in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2004 Jan;112(1):38-43.
121. Frolke JP, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. Reaming debris in osteotomized sheep tibiae. *J Trauma*. 2001 Jan;50(1):65-9; discussion 9-70.
122. Husebye EE, Lyberg T, Opdahl H, Laurvik H, Roise O. Cardiopulmonary response to reamed intramedullary nailing of the femur comparing traditional reaming with a one-step reamer-irrigator-aspirator reaming system: an experimental study in pigs. *J Trauma*. Oct;69(4):E6-14.
123. Pape HC, Zelle BA, Hildebrand F, Giannoudis PV, Krettek C, van Griensven M. Reamed femoral nailing in sheep: does irrigation and aspiration of intramedullary contents alter the systemic response? *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Nov;87(11):2515-22.
124. Lowe JA, Della Rocca GJ, Murtha Y, Liporace FA, Stover MD, Nork SE, et al. Complications associated with negative pressure reaming for harvesting autologous bone graft: a case series. *J Orthop Trauma*. Jan;24(1):46-52.
125. Quintero AJ, Tarkin IS, Pape HC. Technical tricks when using the reamer irrigator aspirator technique for autologous bone graft harvesting. *J Orthop Trauma*. 2010 Jan;24(1):42-5.
126. Belthur MV, Conway JD, Jindal G, Ranade A, Herzenberg JE. Bone graft harvest using a new intramedullary system. *Clin Orthop Relat Res*. 2008 Dec;466(12):2973-80.
127. McCall TA, Brokaw DS, Jelen BA, Scheid DK, Scharfenberger AV, Maar DC, et al. Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator bone graft: technique and case series. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):63-73; table of contents.
128. Silva JA, McCormick JJ, Reed MA, Morse AS, Heffernan MJ, Lavado RD, et al. Biomechanical effects of harvesting bone graft with the Reamer/Irrigator/Aspirator on the adult femur: a cadaver study. *Injury*. Nov;41S2:S85-S9.
129. Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C, Spine Interbody Research G. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech*. 2005 Feb;18 Suppl:S77-81.
130. Newman JT, Stahel PF, Smith WR, Resende GV, Hak DJ, Morgan SJ. A new minimally invasive technique for large volume bone graft harvest for treatment of fracture nonunions. *Orthopedics*. 2008 Mar;31(3):257-61.

131. Kanakaris NK, Morell D, Gudipati S, Britten S, Giannoudis PV. Reaming Irrigator Aspirator system: early experience of its multipurpose use. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 4:S28-34.
132. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct(355 Suppl):S116-23.
133. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine*. 1999 Jun;5(6):623-8.
134. Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, Phillips FM, Anderson DG, Albert TJ, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2008 May-Jun;8(3):457-65.
135. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2011 Jun;11(6):471-91.
136. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Nov;114(6):1502-8.
137. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013 Feb;133(2):153-65.
138. Mooren RE, Dankers AC, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2010 Apr;39(4):371-8.
139. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbuhl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*. 2008 Oct;29(29):3983-92.
140. Kalen A, Wahlstrom O, Linder CH, Magnusson P. The content of bone morphogenetic proteins in platelets varies greatly between different platelet donors. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Oct 17;375(2):261-4.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Art.Nr.	Artikelnummer
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bzw.	beziehungsweise
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
GH	Growth hormone / Wachstumshormon
IGF	Insulin-like Growth Factor
PDGF	Platelet derived growth factor
rhBMP-2	rekombinat humanes Bone Morphogenetic Protein 2
RIA	Reamer Irrigator Aspirator
Tab.	Tabelle
TGF-a	Transforming Growth Factor alpha
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelia Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen der sekundären Frakturheilung sowie deren Zeitdauer (22) .....	13
Abbildung 2: konventionelles Röntgenbild in zwei Ebenen einer hypertrophen Pseudarthrose am distalen Unterschenkel 11 Monate nach initialer Verletzung(24)	14
Abbildung 3: Atrophe Pseudarthrose einer Unterschenkelfraktur 16 Monate nach initialer Verletzung im konventionellen Röntgen (24).....	15
Abbildung 4: (a) Extraossäres Ossikel in der Rektusscheide eines Kaninchens nach Implantation von demineralisierter Knochenmatrix; (b) Schematische Darstellung der Transformation von demineralisierter Knochenmatrix zu neuem Ossikel (Originalabbildung aus (32) ) .....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Bohrvorgangs bei gleichzeitiger Absaugung des intramedullären Kanals aus der Arbeit von Danckwardt, Lilleström et al. aus dem Jahr 1970 (43).....	20
Abbildung 6: Bohrkopf des RIA-Systems(Reamer Irrigator/Aspirator, Synthes, Paoli, PA, USA) .....	33
Abbildung 7: Blutproben nach Zentrifugation, die oberste Schicht ist thrombozytenarmes Plasma, in der Mitte erkennt man das Thrombozytenkonzentrat und am Boden die Erythrozyten reiche Phase (Quelle: Biomet, Warsaw, In, USA)..	37
Abbildung 8: Konzentrationen der untersuchten Wachstumsfaktoren im Beckenkammspan und Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht.....	47
Abbildung 9: 3,5 fach höhere Konzentration von TGF-β1 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht .....	48
Abbildung 10: 1,6 fach höhere Konzentration von IGF-1 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht .....	49
Abbildung 11: 2,1 fach erhöhte Konzentration von FGFa (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht .....	49
Abbildung 12: Signifikant höhere Konzentration von FGFb (ng/g Probe) in Beckenkammspan im Vergleich zum Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht (*p=0.026; t-Test) .....	50
Abbildung 13: 2,9 fach erhöhte Konzentration von PDGFbb (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht .....	50

Abbildung 14: signifikant höhere Konzentration von VEGF (ng/g Probe) in Beckenkammspan im Vergleich zu Bohrmehl nach Normalisierung auf Probengewicht(* p=0,004 ; t-Test) .....	51
Abbildung 15: 3,0 fach höhere Konzentration von BMP-2 (ng/g Probe) in Bohrmehl im Vergleich zu Beckenkammspan nach Normalisierung auf Probengewicht .....	51
Abbildung 16: Konzentration von IGF-1 (ng/ml) in PRP,PPP und Spülflüssigkeit (PPP vs. Spülflüssigkeit: p=0,03 (ANOVA, Bonferroni)).....	52
Abbildung 17: Konzentration von TGF-β1(ng/ml) in PRP,PPP und Spülflüssigkeit (* PRP vs. PPP: p=0,002 (ANOVA, Bonferroni)).....	53
Abbildung 18: Konzentration von PDGFbb in PRP, PPP und Spülflüssigkeit (* PRP vs. PPP: p<0,002; ** PRP vs. Spülflüssigkeit: p=0,002 (ANOVA, Bonferroni)).....	54
Abbildung 19: Konzentration von VEGF (pg/ml) in PRP,PPP und Spülflüssigkeit ( *,** PRP vs. PPP und Spülflüssigkeit p<0,001 (ANOVA, Bonferroni)) .....	54
Abbildung 20: Konzentration von FGFb (ng/ml) in PRP,PPP und Spülflüssigkeit (Spülflüssigkeit vs. PRP: p=0,011; Spülflüssigkeit vs. PPP: p=0.002 (ANOVA, Bonferroni)).....	55
Abbildung 21: Konzentration von BMP-2 (ng/ml Probe) in PRP, PPP und Spülflüssigkeit.....	56
Abbildung 22: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Beckenkammspan und Bohrmehl nach Normalisierung auf Gesamtproteinmenge .....	58
Abbildung 23: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im PRP, PPP und Spülflüssigkeit nach Normalisierung auf Gesamtproteinmenge.....	58

## 8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ursprung, Wirkmechanismus der analysierten Wachstumsfaktoren in der Frakturheilung.....	30
Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung .....	32
Tabelle 3: Verdünnung der Proben zur Gesamtproteinbestimmung .....	39
Tabelle 4: Sensitivität gemessen als minimal nachweisbare Dosis (MND) sowie Präzision gemessen in Intra- und Interassay Variationskoeffizienten für die verwendeten ELISA-Kits.....	42
Tabelle 5: Volumina von Proben und Assaydiluent und Unterschiede in der Durchführung der einzelnen Immunoassays bezüglich Inkubation und Waschen ....	44
Tabelle 6: Gesamtproteinkonzentrationen sowie deren Verhältnis in den analysierten Materialien (* <sup>1</sup> p=0,0006, * <sup>2</sup> p=0,001, ANOVA, Bonferroni) .....	46

## 9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Sebastian Herrmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Quantifizierung von Wachstumsfaktoren in Bohrmehl, Beckenkamm-Spongiosa, Plasma und Platelet Rich Plasma“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Sebastian Herrmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: G. Schmidmaier, S. Herrmann, J. Green, T. Weber, A. Scharfenberger, N.P. Haas, B. Wildemann, Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest and platelet preparation, Bone, 2006 Nov; 39(5):1156-63

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der Analysen sowie Datenerhebung
- Statistische Auswertung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **10. LEBENSLAUF**

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

## 11. PUBLIKATIONEN

The metaphyseal bone defect predicts outcome in reverse shoulder arthroplasty for proximal humerus fracture sequelae. Greiner S, Uschok S, Herrmann S, Gwinner C, Perka C, Scheibel M. Arch Orthop Trauma Surg. 2014 Mar 30

Lateralized reverse shoulder arthroplasty maintains rotational function of the remaining rotator cuff. Greiner S, Schmidt C, König C, Perka C, Herrmann S. Clin Orthop Relat Res. 2013 Mar;471(3):940-6

Arthroscopic refixation of a combined fracture of the greater and lesser tuberosity of the proximal humerus. Pauly S, Herrmann S, Perka C, Greiner S. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2013 May;21(5)

Reverse shoulder arthroplasty leads to significant biomechanical changes in the remaining rotator cuff. Herrmann S, König C, Heller M, Perka C, Greiner S. J Orthop Surg Res. 2011 Aug 16;6:42.

Degenerative changes of the deltoid muscle have impact on clinical outcome after reversed total shoulder arthroplasty. Greiner SH, Back DA, Herrmann S, Perka C, Asbach P. Arch Orthop Trauma Surg. 2010 Feb;130(2)

Stabilisation of vertical unstable distal clavicular fractures (Neer 2b) using locking T-plates and suture anchors. Herrmann S, Schmidmaier G, Greiner S. Injury. 2009 Mar;40(3):236-9

[Classification and diagnostics of unstable shoulders]. Greiner S, Herrmann S, Gerhardt C, Scheibel M. Orthopäde. 2009 Jan;38(1):6-8, 10-5

Mid to long-term results of open acromioclavicular-joint reconstruction using polydioxansulfate cerclage augmentation. Greiner S, Braunsdorf J, Perka C, Herrmann S, Scheffler S. Arch Orthop Trauma Surg. 2009 Jun;129(6):735-40

Mechanical properties of reconstructed achilles tendon with transfer of peroneus brevis or flexor hallucis longus tendon. Herrmann S, Datta B, Maffulli N, Neil M, Walsh WR. J Foot Ankle Surg. 2007 Nov-Dec;46(6):424-8

Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, Wildemann B. Bone. 2006 Nov;39(5):1156-63

## **12.DANKSAGUNG**

Diese Arbeit widme ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Lena und meinen Kindern Matilda und Hans.