

Konstantin Griesbeck  
Dr. med

## **Die Wirkung von Ad.BMP-2 auf die Knochendefektheilung am Beckenkamm des Schafes**

Geboren am 20.11.1976 in Eichstätt  
Staatsexamen am 22.06.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Orthopädie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph A. Lill

Obwohl derzeitige Behandlungsstrategien für die Mehrzahl von Frakturen als ausreichend angesehen werden, gibt es noch immer unzufriedenstellende Ergebnisse bei der Therapie. Diese Problemfälle treten zum Beispiel bei Knochendefekten kritischer Größe auf, wie sie bei Traumata oder nach Tumorresektionen vorkommen. Aber auch eine verzögerte Frakturheilung, die beispielsweise bei Diabetespatienten oder bei Patienten, die an Osteoporose leiden, beobachtet wird, stellt noch immer oft eine große Herausforderung im klinischen Alltag dar. Für diese Problemfälle ist es notwendig, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Wachstumsfaktoren wie die Gruppe der bone morphogenetic proteins (BMPs) stellten sich dabei als erfolgversprechend für neue Behandlungskonzepte heraus. In der Applikation dieser Wachstumsfaktoren bietet der Gentransfer durch adenovirale Vektoren innovative Möglichkeiten.

Frühere Studien, die sich der in-vivo-Applikation von BMP-2 durch adenovirale Vektoren (Ad.BMP-2) bedienten, konnten dabei an Kleintiermodellen wie Ratten oder Hasen die osteoinduktive Wirkung nachweisen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von Ad.BMP-2 auf die Knochendefektheilung am Schaf, also am Großtiermodell, zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden dabei an gesunden und osteoporotischen Tieren durchgeführt. Bei allen Versuchstieren wurden auf beiden Beckenkammseiten Knochendefekte gesetzt. Die linken Seiten wurden jeweils mit Ad.BMP-2 beziehungsweise bei den Kontrolltieren mit NaCl behandelt. Die rechten Seiten blieben unbehandelt, um einen möglichen systemischen Effekt der Behandlung auf contralateraler Seite evaluieren zu können.

Es wurden drei Gruppen gebildet. Gruppe 1 (n=6) bekam Ad.BMP-2 verabreicht. Gruppe 2 (n=5) diente mit einer NaCl-Behandlung als Kontrollgruppe. Bei Gruppe 3 (n=6), wurde durch eine Kombination aus Ovariectomie, Steroidapplikation, Ca<sup>2+</sup>-arme Diät sowie Immobilisation eine Osteoporose induziert. Diese Gruppe wurde ebenfalls mit Ad.BMP-2 behandelt. Eine ursprünglich im Studiendesign vorgesehene osteoporotische Kontrolltiergruppe konnte auf Grund einer sehr hohen Ausfallrate nicht in die Auswertung mit einbezogen werden.

Acht Wochen nach Erzeugung der Knochendefekte wurden die Tiere euthanasiert und Knochenbiopsate mit den darin enthaltenen zuvor gesetzten Defektstellen entnommen. Von diesen Proben wurde im Mikro-Computertomographen ( $\mu$ -CT) der Knochenstrukturparameter bone volume/total volume (BV/TV) zur Evaluierung des Knocheneinwachses bestimmt. An zuvor erstellten Schnitten wurde histologisch die Fläche des neu eingewachsenen Knochens bestimmt. Wegen des Verdachts auf stattgehabte Entzündungen im Bereich der Defektspalten wurde eine quantitative Evaluation der sich im Defektspalt befindlichen Entzündungszellen vorgenommen. Zur näheren Aufschlüsselung wurde schließlich in zu verschiedenen

Zeitpunkten tiefgefrorenen Tierseren Antikörpersuchtests durchgeführt. Mit Hilfe eines Neutralisationstest wurden die Seren auf Antikörper gegen den Adenovirus sowie mit einer ELISA-Untersuchung auf Antikörper gegen das produzierte humane BMP-2 (hBMP-2) untersucht.

Die  $\mu$ -CT-Untersuchung ergab signifikant mehr eingewachsenen Knochen bei den gesunden Kontrolltieren als bei den gesunden Ad.BMP-2-behandelten Tieren, und zwar sowohl auf behandelter wie auch auf unbehandelter Beckenkammseite. Die verminderte Defektfüllung auch auf unbehandelter Seite könnte möglicherweise für einen systemischen Effekt der Ad.BMP-2-Behandlung sprechen. Die Werte der behandelten osteoporotischen Tiere differieren nicht stark von denen der gesunden behandelten Tiere. Diese Ergebnisse werden durch die Befunde bei den Untersuchungen der eingewachsenen Knochenflächen gestützt. Legt man die Tatsache zugrunde, dass die osteoporotischen Tiere auf Grund ihrer pathologischen Stoffwechsellage in der Fähigkeit ihrer Knochenregeneration eingeschränkt sein mussten, könnte das Abschneiden dieser Tiere durchaus für einen positiven Effekt der Ad.BMP-2-Behandlung sprechen.

Ein Grund für das schlechte Abschneiden der gesunden Ad.BMP-2-behandelten Tiere könnte eine stattgefundene Entzündungsreaktion sein. Tatsächlich findet sich bei der quantitativen Untersuchung der Entzündungszellen eine signifikant höhere Anzahl bei den gesunden behandelten verglichen mit den Kontrolltieren. Vergleichbare Ergebnisse auch auf den unbehandelten Beckenkammseiten lassen einen systemischen Effekt annehmen. Bei den osteoporotischen Ad.BMP-2-behandelten Tieren zeigt sich jedoch eine signifikant geringere Entzündungszellanzahl als bei den gesunden Tieren mit Vektor-Behandlung, die beiden unbehandelten Seiten weisen jeweils in die selbe Richtung. Eine Erklärung dafür könnte die immunsupprimierende Wirkung der zur Osteoporose-Induktion notwendigen Steroidtherapie sein.

Bei den Antikörpersuchtests konnte bei allen Ad.BMP-2-behandelten Tieren, also sowohl bei den gesunden als auch bei den osteoporotischen, Antikörper gegen Adenovirus-5 im Serum nachgewiesen werden. Im Blut der Kontrolltiere fanden sich keine Antikörper. Ein signifikant erhöhter Wert im ELISA-Test als Hinweis auf eine Antikörperbildung gegen hBMP-2 ergab sich ausschließlich bei den gesunden, Ad.BMP-2-behandelten Tieren. Weder bei der gesunden Kontrolltiergruppe noch bei der osteoporotischen Versuchstiergruppe fanden sich Hinweise auf gebildete Antikörper gegen hBMP-2.

In dieser Studie führte adenoviraler Gentransfer von BMP-2 bei den gesunden Tieren zu geringerem Knocheneinwachs, zu einem systemischen Effekt dieser Wachstumsretardierung, zu einer erhöhten Anzahl von Entzündungszellen und zur Bildung von Antikörper sowohl gegen den Adenovirus als auch gegen das gebildete hBMP-2. Bei den osteoporotischen Tieren könnte ausgehend von einer pathologischen Knochenstoffwechsellage eine, wenngleich auch nicht nachweisbare, Stimulierung der Defektheilung stattgefunden haben. Als Erklärung für die mögliche Wirkungsentfaltung der Ad.BMP-2-Behandlung könnte die Tatsache dienen, dass eine immunsuppressive Stoffwechsellage die Entzündungsreaktion bei den Versuchstieren gering hielt und somit einen positiven Einfluss auf die Knochendefektheilung hatte.