

SCHLUSSBERICHT

Teil I – Kurzbericht

Verbundvorhaben CUVER

„Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung“

Vorgelegt von

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Prof. Georg N. Duda

Prof. Sven Märdian

Förderzeichen

13GW0427D

Laufzeit des Vorhabens

01-11-2020 – 31.12.2024

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

CUVER: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung

Bericht des Verbundpartners Charité, Julius Wolff Institut/CMSC

weitere Partner im Projekt: DOT GmbH, Stryker Trauma GmbH, UKSH Kiel MOIN CC

Sachbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I – Kurzbericht

Aufgabenstellung und Stand der Technik: Das Projektvorhaben CUVER befasst sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung und der prozessseitigen Optimierung einer innovativen Oberflächenmodifikation für medizintechnische Produkte, welche die Zahl Implantat-assoziiertes Infektionen durch eine lokale, temporäre Freigabe von Kupferionen reduzieren soll. Das übergeordnete Ziel der Bemühung liegt hierbei in der zukünftigen Bereitstellung dieser innovativen Technologie mit der Absicht, den klinischen Versorgungsstandard zu verbessern und die indirekten Kosten des Gesundheitssystems zu reduzieren. Die antimikrobielle Wirkung von Kupfer ist bereits aus der Grundlagenforschung bekannt und in der Literatur umfassend beschrieben. Im Vergleich zu bestehenden Ansätzen zum präventiven Schutz gegenüber Implantat-assoziiertes Infektionen bietet Kupfer hierbei deutliche Vorteile, da es zum einen als natürliches Spurenelement des Körpers keinen Fremdkörper darstellt und zum anderen derzeit keine Resistenzen krankenhausesrelevanter Keime gegenüber Kupfer beschrieben sind. Zusätzlich ist aufgrund der essentiellen Bedeutung von Kupfer für den Zellstoffwechsel im menschlichen Körper eine Verbesserung der natürlichen Frakturheilung durch die lokale Freigabe von Kupferionen ein möglicher Wirkmechanismus – besonders dieser Effekt soll im Rahmen des Verbundprojektes CUVER erstmals präklinisch untersucht werden.

Die Verwendung von Kupfer ist bisher nur aus der Grundlagenforschung bekannt und wurde bislang nicht bis in die klinische Anwendung transferiert (1,2). Die antibakterielle Wirkung von Kupfer zeichnet sich dadurch aus, dass es in bestimmten Konzentrationen in Körperflüssigkeit bereits bakterienhemmende Eigenschaften besitzt, ohne dass hierdurch Zellschädigungen hervorgerufen werden (3). In Vorarbeiten konnte die Funktionalität der antimikrobiellen Oberflächentechnologie bereits dargelegt werden. Neben einer vollständigen Charakterisierung der Freisetzungskinetik des Kupfers von der Implantatoberfläche in verschiedenen Medien, konnte zudem mittels etablierter Testverfahren nach ASTM E-2180 eine Reduktion der Keimbelastung um mehr als 99% (log 2) bei vier der relevanten Krankenhauskeime erreicht werden. Diese Ergebnisse konnten in einer in vivo Kaninchen-Studie unter Beteiligung von DOT bestätigt werden (4). Zusätzlich wurde die innovative Oberfläche umfangreich auf ihre Biokompatibilität nach ISO 10993 untersucht, wobei der Nachweis der grundlegenden biologischen Sicherheit erbracht werden konnte. Im Fokus des Teilvorhabens der Charité steht die prä-klinische Testung der entwickelten Oberflächenbeschichtung in einem Großtiermodell zur Bewertung des regenerativen Prozesses der Knochenheilung. Das Schafmodell ermöglicht im Vergleich zur Kleintierstudie den Gebrauch humaner Implantate, wobei zudem durch das Gewicht und die Körpermaße des Tiers eine vergleichbare Biomechanik zur finalen Anwendung im erwachsenen Menschen simuliert werden kann.

Ablauf des Vorhabens: Untersucht wird der Einfluss der Kupferbeschichtung auf die Knochenheilung unter Anlehnung an die gute Laborpraxis (GLP-like). Mit dem Ziel möglichst keine adversen Effekte während der Heilungsphase unter lasttragenden Bedingungen, welche denen im menschlichen Körper entsprechen, festzustellen, besteht das Arbeitspaket aus fünf konsekutiven Teilabschnitten:

1. Anatomiestudien: Die Charité führte zunächst eine Kadaverstudie durch, die ein für ein für die Studie optimales Implantat definierte. Diese Testungen zeigen, dass der Ø8mm Humerusnagel mit einer Länge von 180 mm gut in die Schafttibia passt und dass eine Fixation mit zwei proximalen und

drei distalen Verriegelungsbolzen der physiologischen Belastung durch das Schaf standhalten wird. Nicht zuletzt deswegen, weil das System relativ viel Spiel hat und dadurch flexibel bleibt

2. Genehmigung der Studie: Zur Beantragung wurden benötigt: Literaturrecherche durch die Fachtierärzte für Versuchstierkunde der Charité zur Erstellung des Datenbankprotokolls; Planung der Studie mit Erarbeitung der Statistik; Belastungsbeurteilung des Tierversuches. Die Genehmigung für den Großtierversuch wurde durch das LaGeSo Berlin erteilt.

3. Dokumentation der Studie (GLP): Um eine GLP angelegte Dokumentation zu gewährleisten wurden die betroffenen Einrichtungen der Charité in Zusammenarbeit mit Stryker einem Audit unterzogen. Die GLP angelegte Dokumentation wurde durch die Charité etabliert und im Versuch durchgeführt

4. Prä-klinische Testung: Die Tiere wurden eingestellt und nach und nach in den Versuch genommen. Dazu wurden sie eingewöhnt, so trainiert, dass eine stressfreie Kontrolle im Versuch ermöglicht war, operiert und dabei zufällig der Test- oder Kontrollgruppe zugeordnet, in der Nachsorge betreut und schließlich finalisiert.

5. Analyse und Bewertung der Ergebnisse: Die aus der Großtierstudie gewonnenen Proben wurden nach der Entnahme in geeigneter Weise aufbereitet und der Analyse zugeführt. Je nach Analyse wurden die Proben frisch verarbeitet oder fixiert. Die Analyse erfolgte computertomografisch, biomechanisch, histologisch, histomorphometrisch und immunhistochemisch.

Wesentliche Ergebnisse: Eine Tibiaosteotomie von standardisierten 3mm wurde mittels Humerusnagel stabilisiert, dabei wurden zwei Gruppen operiert, 7 Tiere erhielten einen Kupfernagel, 6 Tiere erhielten einen Kontrollnagel, die Analyse erfolgte verblindet. Der Knochen in diesem Modell heilt über eine Kallusbildung in der Standzeit von 9 Wochen, allerdings erfolgt keine vollständige knöcherne Konsolidierung. Die Evaluierung der systemischen Parameter, Blutanalyse und Untersuchung der ausführenden Organe, ergaben keine nachteiligen Effekte durch die Kupferbeschichtung. Der biomechanische Auszugversuch ergab keine Unterschiede, so dass auch mit der Kupferbeschichtung eine Implantatentfernung möglich ist. Beide Gruppen zeigten vergleichbare Werte in der radiologischen Auswertung der Knochenheilung. Auch die histologischen Parameter weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Die Studie ergab somit keine negativen Auswirkungen auf die Knochenheilung durch die Kupferbeschichtung, allerdings konnten auch keine positiven Effekte festgestellt werden.

Zusätzlich wurden nichtlasttragende kleine Schrauben in den Knochen eingebracht, um zu untersuchen, ob die Kupferbeschichtung hier negative Auswirkungen hat. Auch die Analyse des Einwachsverhaltens der Schrauben mit der Beschichtung zeigte keinerlei negative Effekte. Somit könnte die Beschichtung

Referenzen:

1. Foster HA, Sheel DW, Sheel P, Evans P, Varghese S, Rutschke N, et al. Antimicrobial activity of titania/silver and titania/copper films prepared by CVD. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2010 Dec 15;216(2-3):283-9.
2. Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2009;33(6):587-90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19195845>
3. Gould SW, Fielder MD, Kelly AF, El Sankary W, Naughton DP. Antimicrobial pomegranate rind extracts: enhancement by Cu(II) and vitamin C combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Biomed Sci* [Internet]. 2009;66(3):129-32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19839222>
4. Prinz C, Elhensheri M, Rychly J, Neumann HG. Antimicrobial and bone-forming activity of a copper coated implant in a rabbit model. *J Biomater Appl* [Internet]. 2017;32(2):139-49. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28599578>

SCHLUSSBERICHT

Teil II – Eingehende Darstellung

Verbundvorhaben CUVER

„Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung“

Vorgelegt von

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Prof. Georg N. Duda

Prof. Sven Märdian

Förderzeichen

13GW0427D

Laufzeit des Vorhabens

01-11-2020 – 31.12.2024

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Abschlussbericht Teil II	
Projektname	Cuver: Innovative medizintechnische Lösungen zur Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen
Projektnummer	FKZ: 13GW0427D
Studientitel	CUVER – Osteotomiemodell am Großtier: der Einfluss von Kupfer auf das Heilungsergebnis
Zweck und Ziel	Prävention nosokomialer Implantat-assoziiertes Infektionen Präklinische Untersuchung einer antimikrobiellen Oberflächentechnologie auf Kupferbasis im Knochenheilungsmodell im Großtier
Standort	Julius-Wolff-Institut - Zentrum für muskuloskelettale Biomechanik und Regeneration / Berlin Institute of Health at Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany

Präklinischer Untersuchungscode:

Das Projekt ist beim Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin unter der Nummer G 0098/21 registriert.

Titel der Studie: CUVER

Innovative medizintechnische Lösungen zur Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen

Forschungseinrichtungen:	Sponsor:
1. Charité – Universitätsmedizin Berlin BIH - Julius Wolff Institut (JWI) - Center for Musculoskeletal Biomechanics and Regeneration Cranach Haus, Institutsgebäude Süd Campus Virchow-Klinikum Augustenburger Platz 1 13353 Berlin	Dieses Projekt wurde vom BMBF gefördert: FKZ: 13GW0427D

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Ethik	7
3	Einleitung	8
3.1	Ziele	10
3.2	Richtlinien der Testung	11
3.3	Forschungseinrichtungen	11
3.4	Einhaltung der GLP-Richtlinien	12
4	Materialien	12
4.1	Testmaterialien	12
5	Testsystem	12
5.1	Tiermodell	12
6	Methoden	13
6.1	Experimentelles Design	13
6.1.1	OP-Vorbereitung	13
6.1.2	Osteotomie	13
6.1.3	OP Nachsorge	13
6.1.4	Finalisierung und Probenentnahme	14
6.1.5	Gewebeproben	14
6.1.6	Knochenproben	14
6.2	Statistische Auswertung	15
7	Ergebnisse	15
7.1	Systemische Entzündungswerte und Kupferspiegel	15
7.2	Biomechanik	15
7.3	Histologie	16
7.3.1	Gewebeproben	16
7.3.2	Knochenproben	16
7.3.3	Kleine Schrauben	17
7.4	Micro-CT	17
8	Diskussion	18
9	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	18
10	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	18
11	Fortschritte bei anderen Stellen	19
12	Erfolge und geplante Veröffentlichungen	19

1 Zusammenfassung

Das Projektvorhaben CUVER befasst sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung und der prozessseitigen Optimierung einer innovativen Oberflächenmodifikation für medizintechnische Produkte, welche die Zahl Implantat-assoziiertes Infektionen durch eine lokale, temporäre Freigabe von Kupferionen reduzieren kann. Das übergeordnete Ziel der Bemühung liegt hierbei in der zukünftigen Bereitstellung dieser innovativen Technologie mit der Absicht, den klinischen Versorgungsstandard zu verbessern und die indirekten Kosten des Gesundheitssystems zu reduzieren. Die antimikrobielle Wirkung von Kupfer ist bereits aus der Grundlagenforschung bekannt und in der Literatur umfassend beschrieben. Im Vergleich zu bestehenden Ansätzen zum präventiven Schutz gegenüber Implantat-assoziiertes Infektionen bietet Kupfer hierbei deutliche Vorteile, da es zum einen als natürliches Spurenelement des Körpers keinen Fremdkörper darstellt und zum anderen derzeit keine Resistenzen krankenhauserrelevanter Keime gegenüber Kupfer beschrieben sind. Zusätzlich ist aufgrund der essenziellen Bedeutung von Kupfer für den Zellstoffwechsel im menschlichen Körper eine Verbesserung der natürlichen Frakturheilung durch die lokale Freigabe von Kupferionen ein möglicher Wirkmechanismus – besonders dieser Effekt soll im Rahmen des Verbundprojektes CUVER erstmals präklinisch untersucht werden.

Aufgrund der geltenden regulatorischen Rahmenbedingungen und der damit verbundenen Qualitätsansprüche stellt die Translation einer solch vielversprechenden Technologie bis hin zur Marktreife eine beachtliche Herausforderung dar und bedarf der Betrachtung verschiedenster wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Endpunkte, um sowohl die Effektivität und Sicherheit als auch den klinischen Erfolg des finalen Produktes sicherzustellen. Neben der Entwicklung und Optimierung eines kosteneffizienten Beschichtungsprozesses, um die Funktionalität und Wirtschaftlichkeit der Technologie zu gewährleisten, werden innerhalb des Projektvorhabens unter anderem materialeitige Wechselwirkungsprozesse zwischen der Oberflächentechnologie und dem Trägerprodukt, sowie die Auswirkungen lokal freigesetzten Kupfers auf die Frakturheilung prä-klinisch untersucht. Dies erfolgt unter anderem im biomechanisch realistischen Großtiermodell, dem Schaf, in dem die Auswirkung des kupferbeschichteten Implantates auf die Knochenheilung untersucht wird. Aufgrund der breit gefächerten Fragestellungen können die angestrebten Forschungsziele nur durch eine Bündelung der Expertisen der einzelnen Projektpartner erreicht werden, um somit die geforderte Qualität der wissenschaftlichen Daten sicherzustellen.

2 Ethik

- Das zuständige unabhängige Ethikkomitee zur Bewilligung von Tierversuchen im Land Berlin ist das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Turmstr. 21, Haus A, 10559 Berlin. Vor Beginn der prä-klinischen Großtierstudie wurde ein Tierversuchsantrag gestellt. Die Fachtierärzte für Versuchstierkunde des Julius-Wolff-Institutes haben die Genehmigung für den Tierversuch eingeholt. Das Versuchsvorhaben wird unter dem Geschäftszeichen G 0098/21 geführt. Der Tierversuchsantrag beinhaltet die ethische Rechtfertigung des Versuchsvorhabens, welches durch die LaGeSo geprüft und bestätigt wurde. Ebenso wurden die „humane endpoints“ definiert und bestätigt. Teil des Tierversuchsantrages ist zudem ein Literaturprotokoll, welches die aktuelle Literatur im Zusammenhang dieses Versuchsvorhabens auflistet und dokumentiert, dass a) der Versuchsgegenstand zum Zeitpunkt der Antragstellung nicht bekannt ist und das b) keine Alternativmethoden zu dem in vivo Versuch verfügbar sind. Ebenfalls im Tierversuchsantrag eingebettet ist ein Kapitel „Stand der Wissenschaft“, der die aktuelle Literatur zu dieser prä-klinischen Studie beleuchtet.

3 Einleitung

Muskuloskeletale Erkrankungen sind weltweit die Hauptursache für chronische Schmerzen und Einschränkungen der Mobilität (United States Bone and Joint Initiative: The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States. 3rd ed. 2014: United States Bone and Joint Initiative). Einer von zwei Individuen der über 18-Jährigen leidet unter Beschwerden des muskuloskeletalen Systems, eine Rate, die sich auf drei von vier Personen in den über 65-Jährigen erhöht. Momentan sind mehr als 1,3 Millionen Krankenhausbehandlungen auf muskuloskeletale Verletzungen zurückzuführen. Jede dritte stationäre Operation wird an den Haltungs- und Bewegungsorganen vorgenommen. Muskuloskeletale Erkrankungen überwiegen damit Herz-Kreislauf- oder Lungenerkrankungen und sind sogar häufiger als Krebserkrankungen (Gesundheitsreport 2018. Analyse der Arbeitsunfähigkeitsdaten. Beiträge zur Gesundheitsökonomie und Versorgungsforschung, Band 21, Herausgeber Andreas Storm, Vorsitzender des Vorstands der DAK-Gesundheit).

Vier der zehn häufigsten Operationen kommen aus dem Bereich der muskuloskeletalen Erkrankungen und Verletzungen. Darüber hinaus stehen Erkrankungen und Verletzungen der Haltungs- und Bewegungsorgane an der Spitze der Arbeitsunfähigkeit (27 % aller AU-Fälle bzw. 40 % aller AU-Tage). Die sozialökonomischen Auswirkungen sind immens und werden sich als Folge des demografischen Wandels verschärfen. Auf muskuloskeletale Erkrankungen und Verletzungen entfallen ca. 20 % der direkten und annähernd 40 % der indirekten Kosten aus dem Gesundheitssystem. Die größten Herausforderungen in diesem Bereich stellen Biofilme auf Medizinprodukten dar, welche oftmals von nosokomialen Infektionen im Zuge der Behandlung ausgelöst werden und zu einer eingeschränkten Knochenheilung führen bzw. diese gänzlich verhindern. Nicht selten sind an diesen Infektionen multiresistente Keime beteiligt, die sich antibiotisch schwer behandeln lassen und deren Ausbreitung problematisch ist.

Im Fokus dieses Projektes stehen Frakturen der unteren Extremitäten, da hier die Infektionsraten bis zu ca. 15 % betragen können (Infection rates in intramedullary nailing of tibia fractures: a metaanalysis. Guttat S., Beigel C., Buescher R., *White Paper Stryker Trauma GmbH*, May 2018: 1-6). Diese Implantat-assoziierten Infektionen bedürfen häufig einer aufwendigen Therapie oder der Revision des Implantates, da die inflammatorischen Prozesse den Knochenregenerationsprozess vollständig unterbinden können. Darüber hinaus kommt es in 14-18 % der Fälle zu einer verzögerten oder keiner vollständigen Heilung der Fraktur (Factors affecting rates of infection and nonunion in intramedullary nailing. Malik MH, Harwood P., Diggle P., Khan SA., *J Bone Joint Surg Br.* 2004 (86): 556-560; Retrospective analysis of pseudarthrosis and osteomyelitis in polytrauma patients with operative treated femur fractures. Morgenstern M., Hungerer S., Moriarty F., Richards G., Bühren V., 31th Annual meeting of European Bone and Joint Infection Society EBJS 2012 Free Paper 8- Open fractures and Infection Abstract #85).

In-vitro und *in-vivo*-Versuche zeigen hier einen klaren Zusammenhang zwischen bakterieller Besiedlung und beeinträchtigter Knochenheilung (Staphylococcal protein A promotes osteoclastogenesis through MAPK signaling during bone infection. Wang Y., Liu X., Dou C., Cao Z., Liu C., Dong S., Fei J., *J Cell Physiol.* 2017 (232): 2396-2406). Neben der Infektionsproblematik in der Frakturversorgung steigt stetig auch der Bedarf im Bereich der antibakteriellen Prävention. Wie hoch der klinische Bedarf für eine Verbesserung der antibakteriellen Prävention ist, ist auch im Bereich der Endoprothetik sichtbar. Die Anzahl an implantierten Hüft- und Knieendoprothesen steigt in Deutschland kontinuierlich. Für das Jahr 2023 wurden 206.573 endoprothetische Hüftversorgungen und 171.790 endoprothetische Knieversorgungen registriert. Davon sind ca. 10 % Folgeoperationen. Bei sowohl Hüft- als auch Knieendoprothesen sind Infektionen die zweithäufigste Ursache für die Revision (EPRD-Jahresbericht 2024).

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Die Infektionsrate für intramedulläre Tibianägel liegt zwischen 2,8 und 14,9 % (Percutaneous or open Reduction of Closed Tibial Shaft Fractures During intramedullary Nailing Does Not increase Wound Complications, Infection or Nonunion Rates. Auston DA., Meiss J., Serrano R., Sellers T., Carlson G., Hoggard T., Beebe M., Quade J., Watson D., Simpson RB., Kistler B., Shah A., Sanders R., Mir HR., 2017 *J Orthop Trauma*. 2017 (31): 215-219; Management of Open Tibial Shaft Fractures: Does the Timing of Surgery Affect Outcomes? Duyos OA.; Beaton-Comulada D., Davila-Parrilla A., Perez-Lopez JC., Ortiz K., Foy-Parrilla C., Lopez-Gonzalez F., 2017. *J Am Acad Orthop Surg*. (25) 2017: 230-238.), und ist vor allem abhängig vom Schweregrad des Weichteilschadens.

Es gibt diverse technologische Ansätze um die Bakterienkolonisation auf Medizinprodukten, die behandlungsbedingt immer bei einer Operation im Krankenhaus auftreten können, zu reduzieren. Neben Antibiotikabeschichtungen können auch Metallionen oder strukturierte Oberflächen wirksam gegen pathogene Mikroorganismen auf Implantaten eingesetzt werden (Testing of antibiotic releasing implant coatings to fight bacteria in combat-associated osteomyelitis - an in-vitro study, D A Back , N Bormann, A Calafi, J Zech, LA Garbe, M Müller, C Willy, G Schmidmaier, B Wildemann; *Int Orthop*. 2016 May;40(5):1039-47; Tailoring nitric oxide release with additive manufacturing to create antimicrobial surfaces, MK Chug, E Bachtiar, N Narwold, K Gall, EJ Brisbois, *Biomater Sci*. 2021 Apr 21;9(8):3100-3111.; Aspect ratio of nano/microstructures determines Staphylococcus aureus adhesion on PET and titanium surfaces, A-K Meinshausen, M Herbster, C Zwahr, M Soldera, A Müller, T Halle, A F Lasagni, J Bertrand, *J Appl Microbiol*. 2021 Sep;131(3):1498-1514.). Letztere versuchen, durch Mikro- oder Nanostrukturierungen gezielt Proteine selektiv anzuziehen oder Bakterien abzustößeln. Hierzu gibt es gute in-vitro-Ergebnisse, aber nur bedingt belastbare in-vivo-Ergebnisse. In der Unfallchirurgie gibt es bislang generell nur wenige antimikrobielle Lösungen, welche erfolgreich bis zur Marktreife entwickelt wurden. Ein Beispiel ist ein mit Gentamycin beschichteter intramedullärer Nagel (In vivo quantification of gentamicin released from an implant coating, S Nast, M Fassbender, N Bormann, S Beck, A Montali, M Lucke, G Schmidmaier, B Wildemann; *J Biomater Appl*. 2016 Jul;31(1):45-54). Aber auch mit diesem Implantat kann es zu postoperativen Infektionen kommen (Clinical experiences in the use of a gentamicin-coated titanium nail in tibia fractures. Schmidmaier G., Kerstan M., Schwabe P., Südkamp N., Raschke M., *Injury* 2017 (48): 2235-2241).

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die präventive Verwendung von Antibiotika auch immer die Bildung resistenter Bakterienstämme unterstützt.

Trotz intensiver Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet gibt es bis heute kein Implantatsystem, das in der Lage ist, die bakterielle Infektion wirksam einzudämmen und gleichzeitig die Knochenneubildung und damit die Frakturheilung aktiv zu stimulieren. Vor einigen Jahren wurden für Patienten mit Knochentumoren silberbeschichtete Implantate entwickelt (Retrospective evaluation in the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients. Wafa H., Grimer RJ., Reddy K., Jeys L., Abudu A., Carter SR., Tillmann RM., *Bone Joint J* 2015 (97-B): 252-7), mit denen die Infektionsrate der Tumorpatienten von 18% auf 6% deutlich gesenkt werden konnte (Harden J, Von Eiff C, Streitbuenger A et al (2010) Reduction of periprosthetic infection with silver coated megaprosthesis in patients with bone sarcoma. *JSurgOncol*101:389–395). Dabei werden die stark antibakteriellen Eigenschaften der Silberionen genutzt. Die zellschädigende Wirkung der Silberionen wird dabei in Kauf genommen, denn bei dieser Patientengruppe steht der Schutz vor einer Infektion im Vordergrund.

Ziel des vorliegenden Projektes ist nun die Entwicklung eines innovativen Beschichtungsverfahrens zur Funktionalisierung von Implantaten, welche durch eine gezielte und temporäre Freigabe von Kupfer zu einer Reduzierung der klinischen Komplikationen während der nosokomialen Phase, führt. Die antibakterielle Wirkung von Kupferionen ist seit langem bekannt. Die in der Literatur beschriebene antibakterielle Wirkung des Kupfers führt zu einer Reduktion der Bakterienbesiedlung der

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Implantatoberfläche und soll so die Infektionsrate reduzieren (Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications, M Godoy-Gallardo, U Eckhard, LM Delgado, YJ D de Roo Puente, M Hoyos-Nogués, F Javier Gil, RA Perez, Bioact Mater. 2021 May 8;6(12):4470-4490).

Ein weiterer innovativer Ansatz in diesem Projekt beruht auf einer temporären Freisetzung von Kupfer, welche lediglich für die Dauer der nosokomialen Phase, stattfindet. Durch die kurzzeitige Freisetzung soll eine reduzierte Bakterienbesiedlung erreicht werden, ohne evtl. chronische Nebenwirkungen hervorzurufen.

Die gezielt temporäre Freigabe von Kupfer wird durch ein von der DOT (DOT GmbH medical implant solutions, Rostock) geschütztes elektrochemisches Verfahren erzeugt, bei dem Kupfer in eine poröse Oxidschicht auf Implantaten, die Titan enthalten oder aus Titan bestehen, eingetragen wird. Nach der Implantation löst sich das Kupfer durch eine chemische Reaktion von der Oberfläche und wird als Kupferion in das umliegende Gewebe abgegeben. In-vivo-Vorversuche am Ratten- und Kaninchenmodell konnten zeigen, dass das eingelagerte Kupfer spätestens nach 28 Tagen vollständig freigesetzt wird.

Die in diesem Protokoll beschriebene Studie soll die Auswirkung der Kupferfreisetzung auf die Fraktur- und Knochenheilung bestimmen. Die Funktionalität der antimikrobiellen Oberflächentechnologie konnte bereits dargelegt werden und bildet somit den Grundstein der geplanten Forschung und Entwicklungsaktivitäten. Neben einer vollständigen Charakterisierung der Freisetzungskinetik des Kupfers von der Implantatoberfläche in verschiedenen Medien, konnte zudem mittels etablierten Testverfahrens, i.e. ASTM E-2180, eine Reduktion der Keimbelastung um mehr als 99% (log 2) bei vier der relevanten Krankenhauskeime erreicht werden. *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gehören zu den häufigsten Pathogenen, die eine Osteomyelitis verursachen.

Es ist ein mit Kupfer beschichteter Marknagel zur Versorgung einer Tibiaosteotomie beim Schaf zum Einsatz gekommen. Das Schafmodell bietet die Möglichkeit humane Implantate zu verwenden (K. Kaspar et al., Angle stable locking reduces interfragmentary movements and promotes healing after unreamed nailing. Study of a displaced osteotomy model in sheep tibiae. *J Bone Joint Surg Am* 87, 2028-2037 (2005)). Zu diesem Zweck wurde ein in der Klinik angewandter verriegelbarer intramedullärer Nagel mit der neu entwickelten Beschichtung versehen. Die eingesetzten Schafe sind vom Gewicht und der Körpermaße mit einem erwachsenen Menschen vergleichbar. Dadurch bietet dieses Großtiermodell die Möglichkeit, den Test der neuen Implantatbeschichtungen unter biomechanischen Bedingungen durchzuführen, die dem des Menschen vergleichbar sind (A. Trepczynski et al., Patellofemoral joint contact forces during activities with high knee flexion. *J Orthop Res* 30, 408-415 (2012); W. R. Taylor et al., The medial-lateral force distribution in the ovine stifle joint during walking. *J Orthop Res* 29, 567-571 (2011).20-24.; W. R. Taylor et al., Tibio-femoral joint contact forces in sheep. *J Biomech* 39, 791-798 (2006).; I. Kutzner et al., Mediolateral force distribution at the knee joint shifts across activities and is driven by tibiofemoral alignment. *The bone & joint journal* 99-B, 779-787 (2017).) In diesem Versuch wurde die Interaktion der neuen Beschichtung mit dem regenerativen Prozess der Knochenheilung untersucht. Dabei wurde hier das Heilungsergebnis analysiert, wobei die Mineralisierung des Osteotomiespaltes, die Gewebeverteilung im Kallusgewebe ebenso wie das Einwachsverhalten des Nagels analysiert wurde. Zusätzlich wurde die angiogene Wirkung der Kupferbeschichtung analysiert, indem die Revaskularisierung im Heilungsbereich untersucht wurde. Die Kontrollgruppe wurde identisch behandelt, erhält aber anodisierte Nägel mit Standardoberfläche.

3.1 Ziele

- Ziele der präklinischen Großtierstudie:

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Diese Studie dient der präklinischen Prüfung der entwickelten Kupferbeschichtung für Implantate. Das übergeordnete Ziel ist die Analyse der Effekte der Beschichtung auf die Knochenformation. Dieser Prozess ist aufgrund der nacheinander ablaufenden, teilweise überlappenden und sich gegenseitig beeinflussenden Prozesse der Knochenheilung nicht in vitro zu untersuchen. Der Vergleich der Knochenheilung unter Einfluss der Kupferfreisetzung aus der Beschichtung, die Mineralisierung eines Knochenspaltes in einem Zeitfenster, in dem eine humane Fraktur ausheilen würde (die Frakturheilungszeit im Schaf ist der eines Menschen vergleichbar) und der Revaskularisierung der Frakturregion (angiogenes Potential der Kupferbeschichtung) sind Ziele dieses Teilvorhabens.

- Hypothesen der präklinischen Großtierstudie:
 - Eine kupferhaltige Beschichtung von Titanimplantaten hat keinen negativen Einfluss auf die Knochenintegration des Implantates.
 - Eine kupferhaltige Beschichtung mit Konzentrationen, die antimikrobielle Wirkung hat, beeinträchtigt den Heilungsverlauf nicht negativ.
 - Die aus der Beschichtung freigesetzten Kupferionen beeinflussen die Angiogenese während des Knochenheilungsprozesses positiv (in diesem Projekt wird der späte Angiogeneseschritt der enchondralen Ossifikation untersucht).
- Definition des Tiermodells
 - Ein Großtierknochenheilungsmodell bietet die Möglichkeit, die klinischen Implantate prä-klinisch einzusetzen und die Beschichtung unter Bedingungen, die biomechanisch denen des Menschen ähneln, zu untersuchen. Es werden zwei Gruppen von erwachsener Schafen miteinander verglichen in diesem prä-klinischen Test, eine Gruppe erhält einen herkömmlichen Nagel mit einer Oberflächenbearbeitung, die im klinischen Gebrauch standardisiert ist, die andere Gruppe erhält einen gleichen Nagel, der mit einer Kupferbeschichtung versehen ist. Die Auswahl eines geeigneten Nagels für die Untersuchung der Knochenheilung im Großtiermodell wurde mittels Kadaverstudien durchgeführt.

3.2 Richtlinien der Testung

- 1 ISO 10993 Standards: „Biological Evaluation of Medical Devices“: Part 2 (2006): Animal welfare requirements (A 02 ISO-10993-2-2006)
- 2 ISO 10993-6:2016 “Biological evaluation of medical devices“: Part 6: Tests for local effects after implantation.

3.3 Forschungseinrichtungen

Charité – Universitätsmedizin Berlin; BIH - Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration

Die Planung dieses Versuchsvorhabens wurde im Julius-Wolff-Institut und im Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie vorgenommen. Die Einholung der Genehmigung des Tierversuchsvorhabens oblag den Mitarbeitern des Julius-Wolff-Institutes in Zusammenarbeit mit der Advanced Animal Model Unit (AAM) des Berlin Institute of Health – hier ist auch die Leitung der Durchführung des Tierversuches verankert. Die Planung und Durchführung der Operation, von der Einstellungsuntersuchung bis zur Finalisierung und Probenentnahme oblag den Mitarbeitern des Julius-Wolff-Institut und der AAM. Die Probenaufarbeitung und Datenanalyse erfolgten im Julius-Wolff-Institut.

Charité – Universitätsmedizin Berlin; Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM)

Die FEM des Virchow Campus der Charité stellte die Räumlichkeiten für den Tierversuch zur Verfügung, dies schließt die Stallungen und die Operationsräume und auch den Sektionsraum ein. Sämtliche mit der Überwachung und der Hygienekonzeption der Räumlichkeiten verbundenen Aufgaben wurden von

der FEM und ihren Mitarbeitern übernommen. Eine Mitarbeiterin des FEM fungierte als Tierschutzbeauftragte für dieses Tierversuchsvorhaben. Die Tierpfleger, die sich um die Stallungen, die Einstreu und die Fütterung kümmerten, wurden von der FEM bereitgestellt. Diese übernahmen auch das Wiegen der Tiere während der Versuchsdauer. Die medizinische Versorgung der Tiere im Versuch verblieb bei den Mitarbeitern im Julius-Wolff-Institut, wurde aber durch die Mitarbeiter der FEM unterstützt, in dem diese Mitarbeiter eingewiesen und ausgebildet sind in Notfällen lege artis zu handeln und auch eine unverzügliche Finalisierung von Tieren vorzunehmen, die aufgrund unvorhersehbarer Umstände aus dem Versuch genommen werden müssen.

3.4 Einhaltung der GLP-Richtlinien

Diese präklinische Untersuchung wurde unter GLP-like Bedingungen durchgeführt. Sowohl die Räumlichkeiten und Geräte im Julius-Wolff-Institut als auch die in der FEM wurden durch die Firma Stryker einem Audit unterzogen. Die Mitarbeiter sind entsprechend geschult und diese Schulung wurde dokumentiert. Die Dokumentation der Versuchsdurchführung erfolgt nach GLP-Richtlinien, soweit dies möglich ist. Diese Dokumentation verbleibt im Julius-Wolff-Institut.

4 Materialien

4.1 Testmaterialien

Die zu testende Implantate wurden von der Firma Stryker zur Verfügung gestellt, es handelt sich um 16 Humerusnägel mit einer Dimension von 8 x 180 mm (Artikelnummer: 18300818S). Die TEST Nägel wurden durch die Firma DOT vor Lieferung an die Charité mit einer Kupferbeschichtung versehen. Als CONTROL wurden Nägel mit einer Typ 2 Anodisierung verwendet, analog zu der in der Klinik verwendeten und etablierten Oberflächenbearbeitung.

Alle Nägel wurden eindeutig mittels einer Laserbeschriftung gekennzeichnet. Die Nägel erreichten die Charité einzeln steril abgepackt und durch ein Label eindeutig identifizierbar, gebrauchsfertig für die Implantation in die Schafstibia. Beim Einbringen der Nägel war dem Operateur nicht bekannt, ob er einen kupferbeschichteten oder einen nur anodisierten Nagel verwendet, die Nägel sind äußerlich nicht zu unterscheiden. Jeder Nagel wurde mit 5 Verriegelungsbolzen in der Tibia verankert (Rotations- und Längensicherung), diese wurden ebenfalls von Stryker gebrauchsfertig an die Charité geliefert, die Längen entsprechen den individuellen Tibia-Durchmessern der Schafe und werden unter der Operation festgelegt. Alle Verriegelungsbolzen wurden mit einer Typ 2 Anodisierung verwendet.

Zusätzlich wurden 16 Ø2 x 4 mm Schrauben ohne Kupferbeschichtung (CONTROL) und 16 Ø2 x 4 mm Schrauben mit Kupferbeschichtung (TEST) einzeln steril verpackt und gekennzeichnet über Stryker und DOT an die Charité geliefert.

5 Testsystem

5.1 Tiermodell

Diese Studie wurde mit 13 Schafen (Schwarzkopf-Mix) durchgeführt, wobei 6 Schafe der Kontrollgruppe und 7 Schafe der Test-Gruppe operiert wurden. Ursprünglich war eine Gruppengröße von n=8 für beide Gruppen geplant. Drei der Tiere wiesen jedoch einen zu engen Markraum auf, um einen Marknagel implantieren zu können, ohne den Knochen substantiell zu schädigen.

Intramedulläre Nägel mit einer Kupferbeschichtung (TEST) oder mit einer standardisierten, in der Klinik etablierten Oberfläche (Typ 2 Anodisierung, CONTROL) wurden in die Tibia der Schafe implantiert. Diaphysär wurde standardisiert ein Osteotomiespalt von 3 mm erzeugt. Der Knochen wurde im Bereich der Osteotomie von Weichgewebe befreit und es wurde ein Gewebeschutz eingebracht. Die

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Osteotomie wurde unter Vermeidung einer Verletzung des intramedullären Nagels unter ständiger Kühlung gesetzt. Die Nägel wurden proximal (2 Verriegelungsbolzen) sowie distal (drei Verriegelungsbolzen) verriegelt.

Zusätzlich wurden jeweils 2 Ø 2x4 mm Schrauben Osteotomie-fern in den kortikalen Knochen implantiert. Dabei wurden jeweils Testschrauben in Tiere verbracht, die in der Testgruppe sind und Kontroll-Schrauben in Tiere der Kontrollgruppe.

Der Heilungsverlauf wurde mittels Röntgenaufnahmen (jeweils in zwei Ebenen AP und ML) zu den Zeitpunkten t = 3 und t = 6 Wochen nach Osteotomie analysiert. Nach t = 9 Wochen wurde eine Überbrückung des Knochenspaltes erwartet. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere finalisiert und die Knochen der weiteren Analyse zugeführt.

6 Methoden

6.1 Experimentelles Design

6.1.1 OP-Vorbereitung

Die Tiere wurden bei einem designierten Züchter bestellt. Noch beim Züchter wurden vor der Lieferung Untersuchungen durchgeführt, damit wurde ein guter Gesundheitsstatus zu Beginn des Versuches sichergestellt.

Beim Eintreffen in der FEM erhielt jedes Tier eine Eingangsuntersuchung durch einen. Zeitgleich bekam jedes Tier eine Ohrmarke, die als eindeutige Identifizierung während der Versuchsdurchführung verwendet wurde.

Die Tiere wurden in möglichst stabilen sozialen Gruppen in der FEM am Virchow Campus untergebracht.

Die Tiere gewöhnten sich im Anschluss an die neue Umgebung und an die Versuchstierherde und wurden mittels Kraftfuttergabe und Knäckebrot mit den Versuchsdurchführenden vertraut gemacht. Wenn die Tiere handzahn waren, konnten sie in den Versuch genommen werden. Die Aufteilung der Schafe in die beiden Versuchsgruppen erfolgte zufällig.

6.1.2 Osteotomie

Während der Operation wurde ein Anästhesieprotokoll geführt, die Medikation während des Versuches wurde für jedes Tier dokumentiert. In der Narkoseeinleitung wurde bei jedem Tier Blut genommen und auf Entzündungswerte und Kupfergehalt analysiert, um die Basiswerte je Tier zu ermitteln. Damit wurde es möglich zu überprüfen, ob sich durch die Kupferbeschichtung der systemische Kupfergehalt verändert. Während der Operation wurde ein OP-Protokoll geführt.

6.1.3 OP Nachsorge

Die postoperative Analgesie erfolgte zum einen über ein Fentanylpflaster, welches während der Operation in der proximalen Vorderbeinregion angebracht wurde und welches eine dreitägige Wirkungsdauer hat. Zusätzlich bekamen die Tiere für 5-7 Tage (inkl. dem OP-Tag) ein NSAID (non steroideal anti inflammatory drug) 1 x tgl. subkutan verabreicht.

Die Tiere wurden jeden Tag observiert. Dies geschah in den ersten 7 Tagen durch die am Versuch beteiligten Tierärzte und im Folgenden durch Tierärzte, Projektmitarbeiter oder Tierpfleger.

Im Verlauf des Versuches zeigte sich, dass durch eine intramedullärer Osteotomiestabilisierung mittels humanem Humerusnagel im Schaf eine Fixation erfolgt, die zu einer Heilung mit einer Kallusbildung über die Dimension des Knochens hinaus erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass es eine interfragmentäre Beweglichkeit gibt. Daher wurden alle Tiere in den ersten Tagen nach der OP mit einem halbschalen

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Gips versorgt. Keines der Tiere in diesem Versuch erreichte einen „humanen Endpunkt“, alle Tiere, die eine Osteotomie erhalten haben, wurden nach der geplanten Versuchsdauer finalisiert.

6.1.4 Finalisierung und Probenentnahme

9 Wochen nach der Osteotomie erfolgte die Finalisierung in tiefer Narkose. Zu diesem Zeitpunkt wurde erneut Blut genommen, damit Entzündungswerte und Kupfergehalt im systemischen Blut ermittelt werden konnten.

Nach der Finalisierung wurden von jedem Tier Proben genommen, die die Tibiae einschlossen. Alle Proben wurden unverzüglich zur weiteren Verarbeitung ins Julius-Wolff-Institut gebracht. An dieser Stelle wurden die Proben so verblindet, dass die weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden, ohne dass die Gruppenzuordnung bekannt war. Erst, wenn die Daten in die Auswertung gingen, wurde die Gruppenzuordnung aufgedeckt.

6.1.5 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden, um eine Degradation zu verhindern, fixiert und anschließend mit fließendem Leitungswasser gespült. Danach wurden sie für die Paraffineinbettung vorbereitet. Im nächsten Schritt wurden aus den Gewebeproben 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte erhielten eine Übersichtsfärbung, in der die Gewebeintegrität untersucht wurde. Die Schnitte wurden mit einem Leica DM6B Mikroskop fotografiert. Es wurden Übersichtsbilder mit 5-fache Vergrößerung sowie Bilder zur Analyse mit 40-fache Vergrößerung aufgenommen.

Die Gewebeproben wurden auf entzündungsbedingte Zellaggregationen analysiert. Dieses wird in Anlehnung an die ISO 10993-6 durchgeführt. Hierfür wurde ein Score von 0-3 verwendet bei dem ein Score von 0 für keine Einwanderung von Zellen steht und 3 eine sehr starke Einwanderung von Zellen darstellt.

6.1.6 Knochenproben

6.1.6.1 Explantation des Nagels

Im Biomechaniklabor des Julius-Wolff-Institutes wurden erst die Verriegelungsbolzen entfernt und dann die Nägel unter sterilen Kautelen aus dem osteotomierten Knochen mittels Auszugversuch entfernt, ohne den Osteotomiekallus zu beschädigen.

6.1.6.2 Computertomografie (CT)

Die osteotomierte Tibia wurde feucht gehalten und in einer µCT- (mikro Computertomografie) Halterung platziert. Mit dem MILab µCT wurde dann der Osteotomiekallus und seine Umgebung gescannt.

Es wurden zwei unterschiedliche „Volume of Interest“ (VOI) ausgewertet, VOI3 umschließt den gesamten Frakturkallus, VOI1 bildet nur den Frakturspalt ab.

6.1.6.3 Sägeprotokoll

Die kontralaterale Tibia und die osteotomierte, nagelfreie Tibia wurden für die anstehenden Untersuchungen zurechtgesägt. Dazu wurde ausgehend von der Mitte des Osteotomiespaltes nach proximal und distal 11,5 mm gemessen, sodass die Knochenprobe den Osteotomiekallus und jeweils 1 cm des angrenzenden Knochens enthält,

Zusätzliche wurden die Knochensegmente um die Ø2 x 4 mm Schrauben entnommen, von denen in jedem Tier 2 platziert wurden. Dabei wurde um die Schraube herum ein 1 cm großer Knochensaum belassen:

6.1.6.4 Histologische Aufarbeitung der Knochenproben

Für die histologische Aufarbeitung wurden Knochenscheiben zurechtgesägt und für die Paraffinhistologie und für die Kunststoffhistologie vorbereitet.

6.1.6.4.1 Paraffinhistologie

Die Proben für die Paraffinhistologie wurden zunächst entkalkt und dann in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 5 µm dicke Schnitte längs durch den Osteotomiecallus angefertigt. Übersichtsfärbungen wurden mit Hematoxylin Eosin gemacht. Die Paraffinschnitte der Knochenproben wurden auch mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Gefäße wurden mittels alphaSMA und Osteoklasten mittel TRAP Färbung analysiert.

6.1.6.4.2 Kunststoffhistologie

Die Knochenproben, die für die Kunststoffhistologie vorgesehen sind, wurden nach der Fixation direkt eingebettet. Von den Knochenproben, die die Ø2 x 4 mm Schraube enthalten wurden 100 µm dicke Schliffe angefertigt worden. Die Schliffe, die die Ø 2 x 4 mm Schraube enthalten, wurden längs der Schraubenachse angefertigt.

Eine deskriptive Auswertung wurde erstellt, bei der der Kontakt der Schrauben mit dem kortikalen Knochen, Knochenneubildung, Bindegewebe oder leere Areale evaluiert wurden. Weiterhin wurde bewertet, ob der Bohrkanal noch zu erkennen ist, das heißt, die Schraube nicht richtig eingehilt war (Bohrloch erkennbar). Für die gesamte ROI wurden außerdem die Gasvakuolen evaluiert (Vakuolenanzahl, Vakuolengröße).

6.2 Statistische Auswertung

Bei der Analyse der Knochenheilung eines 3 mm Osteotomiespaltes in der Schafttibia nach Versorgung mit einem Humerusnagel wurden zwei Gruppen miteinander verglichen. Eine Gruppe erhält einen herkömmlichen Nagel (Kontrolle), die andere wurde mit einem Nagel versorgt, der mit einer Kupferbeschichtung versehen wurde, die nosokomiale Infektionen verhindern soll. Bei der endgültigen Gruppengröße von n=6-7 ist eine Normalverteilung nicht anzunehmen. Die statistische Auswertung erfolgte daher über einen nicht parametrischen Test, den Mann-Whitney U Test, da die Proben unabhängig voneinander sind. Bei einem p Wert < 0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

7 Ergebnisse

7.1 Systemische Entzündungswerte und Kupferspiegel

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben wurde unmittelbar vor dem operativen Eingriff den Schafen Blut entnommen und ebenfalls zum Zeitpunkt der Finalisierung. Labortechnisch wurden die CRP (C-reaktives Protein) Werte und die Kupferwerte im Blut ermittelt, um zu prüfen, ob eine systemische Entzündung oder eine Erhöhung der systemischen Kupferwerte durch das Einbringen eines Kupferbeschichteten Nagels verursacht wurde.

Diese Untersuchung zeigte, dass das Einbringen des kupferbeschichteten Nagels keinen systemischen Anstieg der Kupferwerte in den Tieren zur Folge hatte.

7.2 Biomechanik

Keine der untersuchten biomechanischen Eigenschaften, Maximalkraft des Auszugs, Haftscherfestigkeit des Nagels, Ausziehweg beim Erreichen der Maximalkraft, Haftsteifigkeit des Nagels, veränderte sich signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit

Kupferbeschichtung. Die Kupferbeschichtung verändert das Einwachsverhalten der Nägel nicht signifikant, was durch den durchgeführten biomechanischen Auszugversuch belegt wurde.

7.3 Histologie

7.3.1 Gewebeprouben

Spezifische Gewebe wurden auf Veränderungen ihrer zellulären Zusammensetzung untersucht, um einen möglichen negativen systemischen Effekt der Kupferbeschichtung bei der Versuchsgruppe auszuschließen. Die Auswertung der entzündungsbedingten Zellaggregationen in den Gewebeprouben, die mittels eines Scoresystems durchgeführt wurde, ließ keine negativen systemischen Einflüsse durch die Kupferbeschichtung erkennen.

7.3.2 Knochenprouben

7.3.2.1 Blutgefäßuntersuchung mithilfe von α -SMA Antikörperfärbung

Kupfer ist für seine antimikrobiellen aber auch für pro-angiogene Einflüsse bekannt, daher wurde in der Knochenmarkshöhle des osteotomierten Knochens unter Einschluss der Kontaktfläche Knochenmark-Implantat die Vaskularisierung analysiert.

Während der Knochenheilung gibt es zwei voneinander getrennte und unterschiedlich ablaufende Revaskularisierungsphasen. Die erste findet direkt nach der Verletzung statt, wenn verletzungsbedingt zerstörte GefäÙe wiederaufgebaut werden. Eine zweite Revaskularisierung erfolgt beim Umbau des avaskulären knorpeligen Kallus zu Geflechtknochen. Die Analyse der GefäÙe, die hier erfolgte kann nur Unterschiede in der zweiten Revaskularisierung aufdecken, obwohl ein Einfluss auf die Angiogenese durch das Kupfer eher während der ersten zu erwarten wäre. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in den untersuchten GefäÙparametern, Anzahl der GefäÙe, GefäÙfläche, GefäÙgröße, GefäÙumfang, festgestellt werden.

7.3.2.2 Osteoklasten Analyse mithilfe von TRAP Antikörperfärbung

Ein gutes Merkmal für eine erfolgreiche Knochenheilung ist ein ausgewogenes Verhältnis von Knochen aufbauenden Osteoblasten und Knochen abbauenden Osteoklasten. Dieses Gleichgewicht bestimmt nicht nur die Knochenheilung, sondern auch das erfolgreiche Remodelling entsprechend der biomechanischen Reize die der Knochen erfährt. Daher wurden die Osteoklasten analysiert, um zu untersuchen, ob dieses Gleichgewicht durch die Kupferbeschichtung gestört wurde.

Das Ergebnis zeigte, dass es keine Veränderung in der Osteoklastenzahl zwischen den Versuchsgruppen gab, was darauf schließen lässt, dass die Kupferbeschichtung nicht zu einem erhöhten Knochenabbau führte.

7.3.2.3 Kontaktanalyse von Knochenmark und Marknagel mithilfe von Hämatoxylin-Eosin Färbung

Eine Analyse der Gewebsverträglichkeit gegenüber dem kupferbeschichteten Nagel wurde durchgeführt, indem der Anteil der Kapselbildung im Markraum untersucht wurde. Um zu verstehen, ob der Nagel zu einem Anstieg der Geflechtknochenbildung in diesem Bereich führte wurde einerseits die Länge der Kontaktfläche zwischen Nagel und Geflechtknochen bestimmt und andererseits der Anteil Geflechtknochen im Markraum im Bereich der Osteotomie.

Ein Unterschied im Verhalten des Gewebes, welches in direktem Kontakt zum Implantat steht konnte nicht festgestellt werden beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen.

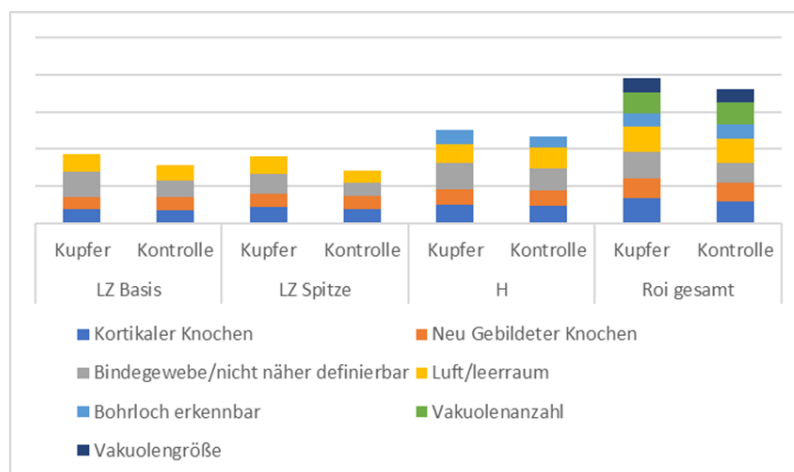
7.3.2.4 Ergebnis der histologischen Knochenproben

Die Auswertung der histologischen Untersuchung der Frakturregion belegt, dass die Kupferbeschichtung der Nägel die Gewebestrukturen im Frakturbereich des Knochens nicht signifikant verändert.

7.3.3 Kleine Schrauben

Um das Einwachsverhalten von Schrauben zu beurteilen, die eine Kupferbeschichtung tragen, wurden zusätzliche Minischrauben eingesetzt. Die Verriegelungsbolzen, die zur Fixation des Marknagels genutzt wurden, enthielten kein Kupfer. Diese Entscheidung wurde getroffen, damit bei einer etwaigen negativen Auswirkung, wie zum Beispiel auftretenden Lysen, eine Lockerung des Implantats vermieden werden kann. Dies hätte die gesamte Studie gefährdet. Um das Einwachsverhalten zu beurteilen wurden die Gewindespitzen, die tief im Knochen lagen beurteilt, um etwaige Lysen zu dokumentieren. Der Kontakt zwischen den Schrauben und dem Knochen wurde aber auch an der Basis des Gewindes und am Schraubenkörper untersucht, hierdurch konnte auch eine mögliche Knochenzubildung beurteilt werden. Zusätzlich dazu wurde analysiert, wie das Gewebe im Kontakt mit den Schrauben aussah. War es kortikaler oder neugebildeter Knochen oder war das Bohrloch noch zu erkennen oder hatte sich Bindegewebe gebildet. Auch das Auftreten von Vakuolen, die auf Lyseprozesse hindeuten könnten, wurde untersucht.

Eine grafische Darstellung der Ergebnisse zeigt, dass die Kupferbeschichtung keinen negativen Einfluss auf das Einheilungsverhalten der kupferbeschichteten Schrauben im Vergleich zur Kontrollgruppe hat:



Die Untersuchung der kleinen Schrauben ergibt keine negativen Effekte durch die Kupferbeschichtung. Allerdings sind hier nicht lasttragende Schrauben untersucht worden und durch ihre geringe Größe ist auch die Menge an Kupfer gering gewesen, so dass diese Ergebnisse gegebenenfalls noch einmal verifiziert werden müssen in einem Versuch, der dem klinischen Alltag ähnelt. Diese Voruntersuchung lässt aber den Einsatz von kupferbeschichteten Schrauben in einem lasttragenden Bereich in einer prä-klinischen Studie realistisch erscheinen, was ohne diese Ergebnisse nicht möglich wäre.

7.4 Micro-CT

Die Knochenmineralisierung wurde für die beiden Versuchsgruppen nach dem Auszug des Nagels mittels computertomografischer Analyse untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Parameter analysiert: BV = Knochenvolumen; TV = Gesamtkallusvolumen; BS/BV = Verhältnis von Knochenoberfläche zu Volumen; BV.MEAN = Mineraldichte des Knochens; TbNb = Trabekel Anzahl; Th.Mean = mittlere Trabekeldicke; Sp.Mean = mittlere Separation der Trabekel; B.Pm Mean =mittlerer Kallus Umfang; T.Th Mean = mittlerer Kallusdurchmesser

Die analysierten Parameter zur Mineralisierung und Knochenqualität im Osteotomiebereich der beiden Untersuchungsgruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede. Weder Knochenmenge noch Knochenqualität waren durch die Kupferbeschichtung negativ beeinflusst worden.

8 Diskussion

Die präklinische Evaluation der Kupferbeschichteten Nägel hat in den durchgeführten Analysen keine signifikante Veränderung ergeben.

Da in diesem Modell keine Infektion vorlag ist eine Aussage über die antimikrobielle Wirkung des Nagels nicht zu treffen.

Die Ergebnisse der Studie legen nahe, dass die Anwendung einer Kupferbeschichtung, wie sie hier untersucht wurde, sicher ist für Implantate, die zur Stabilisierung von frakturierten Knochen eingesetzt werden, und dass keine negativen Einflüsse auf die Heilung zu erwarten sind..

Könnten die im Projekt formulierten Hypothesen der präklinischen Großtierstudie bestätigt werden?

- Eine kupferhaltige Beschichtung von Titanimplantaten hat keinen negativen Einfluss auf die Knochenintegration des Implantates: Der durchgeführte Auszugversuch nach einer Einheilungszeit von 9 Wochen hat gezeigt, dass der kupferbeschichtete Nagel sich bezüglich der Integration des Implantats nicht von einem anodisierten kein Kupfer enthaltenden Nagel unterscheidet. Eine Entfernung des Implantats ist problemlos möglich.
- Eine kupferhaltige Beschichtung mit Konzentrationen, die antimikrobielle Wirkung hat, beeinträchtigt den Heilungsverlauf nicht negativ: Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der Analyse der Knochenheilung im Schafmodell bestätigt, negative Effekte der Kupferbeschichtung auf den Heilungsverlauf konnten nicht nachgewiesen werden.
- Die aus der Beschichtung freigesetzten Kupferionen beeinflussen die Angiogenese während des Knochenheilungsprozesses positiv (in diesem Projekt wird der späte Angiogeneseschritt der enchondralen Ossifikation untersucht): Diese Hypothese kann nicht bestätigt oder widerlegt werden. Der späte Angiogeneseschritt blieb durch die zu Beginn der Heilung freigesetzten Kupferionen unbeeinflusst. Trotzdem kann es sein, dass die frühe Revaskularisierung durch die Freisetzung der Kupferionen aus dem Implantat unterstützt wurde. Um diese Frage eindeutig beantworten zu können müsste ein früherer Zeitpunkt untersucht werden. Im Sinne der 3R und zur Reduzierung der Tierzahlen wurde in diesem Projekt davon abgesehen. Die Studie konnte zwar keinen positiven Kupfereffekt aufzeigen, belegt jedoch eindeutig, dass von der Kupferbeschichtung kein negativer angiogener Effekt ausgeht.

9 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der durchgeführte Umfang der Arbeiten entspricht den geplanten Arbeitsschritten für den Nachweis einer sicheren Anwendung einer Kupferbeschichtung im Großtierosteotomiemodel. Zur Vorbereitung einer klinischen Anwendung war eine enge und partnerschaftliche, interdisziplinäre Zusammenarbeit aller Verbundpartner notwendig, wodurch die Projektziele erreicht wurden. Die Projektmittel wurden sorgsam verwendet und nur in dem zur Erfüllung der Forschungsaufgaben erforderlichen Rahmen eingesetzt.

10 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Implantatassoziierte Infektionen stellen ein relevantes klinisches Problem dar, welches sich durch eine Häufung von Resistenzen gegen verfügbare Antibiotika noch verschärfen wird. Eine

Verbundprojekt: Prävention Implantat-assoziiertes Infektionen mittels innovativer Beschichtung (CUVER)

Implantatbeschichtung, die sicher in der Anwendung ist und gleichzeitig nosokomiale Infektionen reduzieren kann wird daher von großen Medizinischen Nutzen sein. Diese Studie hat wertvolle Beiträge geleistet, die Translation zu ermöglichen.

11 Fortschritte bei anderen Stellen

Während der Bearbeitung des Projektes sind dem Projektteam keine Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden.

12 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Es befinden sich zwei Publikationen in der Planung, die das Osteotomiemodell und die unveränderte Knochenheilung durch die Kupferbeschichtung beinhalten sollen.