

Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)  
Im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Tissue Engineering von Knochen

Vergleichende Untersuchung der Differenzierung  
humaner Knochenmarkstromazellen (hBMSC)  
auf Kalziumkarbonat- Biomaterialien unter Verwendung  
zweier unterschiedlicher Besiedelungstechniken

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Nils Lohse

aus  
München

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake
II. Berichterstatter/ -in:	Priv.-Doz. Dr. med. dent. Gersdorff
III. Berichterstatter/ -in:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Crozier
Tag der mündlichen Prüfung:	19.10.2011



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	<b>Knochengewebe und Stoffwechselfvorgänge</b>	6
1.1.1	Physiologie des Knochens	6
1.1.2	Regulation des Knochenstoffwechsels	9
1.2	<b>Knochenersatzmaterialien</b>	10
1.2.1	Versorgung von Knochendefekten	10
1.2.2	Autologer Knochenersatz	11
1.2.3	Allogener Knochenersatz	12
1.2.4	Xenogener Knochenersatz	13
1.2.5	Alloplastischer Knochenersatz	14
1.3	<b>Tissue Engineering</b>	15
1.3.1	Grundlagen	15
1.3.2	Zellpopulation	16
	1.3.2.1 Adulte Stammzellen	16
	1.3.2.2 Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)	16
	1.3.2.3 Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	18
1.3.3	Zellkultivierung	19
1.3.4	Biomaterialien als Träger für 3D- Zellkulturen	20
1.3.5	Wachstumsfaktoren	21
1.3.6	Besiedlung	23
1.4	<b>Aufgabenstellung</b>	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	<b>Geräte und Laborausstattung</b>	26
2.1.1	Zellkultur	26
2.1.2	Histologische Bearbeitung	26
2.2	<b>Reagenzien und Lösungen</b>	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Histologische Bearbeitung	27
2.2.3	Fluoreszenzfärbung	27
2.3	<b>Sterilbedingungen</b>	28

<b>2.4</b>	<b>Zellkultivierung</b>	28
2.4.1	Zellgewinnung der Stromazellen	28
2.4.2	Zellisolierung Mononukleärer Zellen	28
2.4.3	Passagieren der humanen Knochenmarkstromazellen	29
2.4.4	Zellsortierung mit Cyto- FACS	30
2.4.4.1	Grundlagen	30
2.4.4.2	Stromazellen gesamt	31
2.4.4.3	FITC-Kontrolle	32
2.4.4.4	CD 73	33
2.4.4.5	CD 105	34
2.4.4.6	CD 90	35
2.4.4.7	CD 45	36
2.4.4.8	Bewertung der FACS-Analyse	37
2.4.5	Zellzählung mit Casy	37
<b>2.5</b>	<b>Biomaterial und Besiedelung</b>	38
2.5.1	Trägermaterial	38
2.5.2	Besiedelung der Träger mit humanen Knochenmarkstromazellen	38
<b>2.6</b>	<b>Histologische Bearbeitung</b>	39
2.6.1	Einbettung	39
2.6.2	Anfertigung der Trägerschnitte	39
2.6.3	Entplastung der Trägerschnitte	40
<b>2.7</b>	<b>Fluoreszenzfärbungen</b>	40
<b>2.8</b>	<b>Mikroskopische Untersuchung</b>	40
<b>2.9</b>	<b>Quantitative Erfassung der Fluoreszenzmaxima</b>	42
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Differenzierungsvorgängen im Trägermaterial</b>	43
3.1.1	Verbesserte Darstellung durch das Apotome <sup>®</sup> - Modul	43
3.1.2	Erfassung von Differenzierungsvorgängen	44
3.1.3	Darstellung der zellulären Differenzierung zu den verschiedenen Zeitpunkten	46

<b>3.2</b>	<b>Vergleich der Besiedlungstechniken</b>	<b>47</b>
3.2.1	Zellkernmarker DAPI	47
3.2.2	Differenzierungsmarker Osteokalzin	49
3.2.2.1	Quantitative Analyse	49
3.2.2.2	Prozentuale Analyse	51
3.2.3	Differenzierungsmarker VEGF	53
3.2.3.1	Quantitative Analyse	53
3.2.3.2	Prozentuale Analyse	55
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methode</b>	<b>59</b>
4.1.1	Humane Knochenmarkstromazellen	59
4.1.2	Trägermaterial für die dreidimensionale Zellkultur	60
4.1.3	Besiedlung der Trägermaterialien	60
4.1.4	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit dem ApoTome®	62
<b>4.2</b>	<b>Bewertung der Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>80</b>
<b>7.1</b>	<b>Verteilung der erfassten Fluoreszenzen</b>	<b>80</b>
7.1.1	DAPI Verteilung	80
7.1.2	Verteilung Osteokalzin	81
7.1.3	Verteilung Osteokalzin in %	82
7.1.4	Verteilung VEGF	83
7.1.5	Verteilung VEGF in %	84
<b>7.2</b>	<b>Vergleich Zentrum gegen Peripherie</b>	<b>85</b>
7.2.1	Regionale Verteilung der Zellkernerfassung	85
7.2.2	Regionale Verteilung der Expression von Osteokalzin	86
7.2.3	Regionale Verteilung der Expression von VEGF	87

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Knochengewebe und Stoffwechselfvorgänge

#### 1.1.1 Physiologie des Knochens

Knochengewebe übernimmt als Teil des Bewegungsapparates und des Skelettsystems eine wichtige Stützfunktion, und ist somit entscheidend für die äußere Form unseres Körpers verantwortlich. Der strukturelle Aufbau aus einer mineralisierten Phase und einer organischen Matrix, sowie die Fähigkeit zur Adaptation ermöglichen eine hohe Zug- und Druckfestigkeit.

Knochen bietet inneren Organen, dem zentralen Nervensystem und dem blutbildenden Gewebe Schutz vor äußeren Einwirkungen. Seine Funktion als Speicher leistet das Knochengewebe durch seinen Aufbau aus Mineralsalzen, wodurch es an der Regulation des Elektrolythaushaltes von Kalzium- und Phosphationen beteiligt ist.

Histologisch lassen sich im Knochen verschiedene Typen von Zellen unterscheiden.

So finden sich Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoprogenitorzellen sind mesenchymalen Ursprungs, und gelten als Vorläuferzellen der Osteoblasten (Triffitt 2002).

Osteoblasten sind kubische, matrixbildende, stoffwechselaktive Zellen, die an der Oberfläche der Knochenbälkchen sitzen und, über Nexus verbunden, Kollagen, Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin und Osteonektin in den Extrazellularraum sezernieren. Sie produzieren Wachstumsfaktoren, die nach Sekretion para- und autokrin stimulieren können. In Ihrer Synthesephase haben sie ein hochprismatisches Aussehen. Je weiter die Syntheseleistung abnimmt, desto flacher werden sie. Osteoblasten bilden Fortsätze aus, um mit ihren Nachbarzellen in Verbindung zu stehen.

Aus Osteoblasten gehen Osteozyten hervor, die in Lakunen der Matrix eingelagert sind.

Auch sie bilden in Kanalikuli verlaufende Fortsätze mit benachbarten Osteozyten aus, die über Nexus verbunden sind. So wird ein über die verknöcherte Grundsubstanz hinweg ausgedehntes Netzwerk geschaffen, wodurch ein Stoffaustausch untereinander, aber auch von Osteoblasten über Fortsätze mit den Osteozyten möglich ist.

Osteoklasten sind für den Knochenabbau und seine Resorption zuständige mehrkernige Zellen, die sich aus dem mononukleären Phagozytensystem entwickeln.

Durch Aktivierung membranständiger Rezeptoren (RANK= „*receptor activator of nuclear factor kappa B*“), sowie durch stimulierende Faktoren (M-CSF =“*monocyte colony stimulating factor*“) können monozytäre Zellen aktiviert werden, fusionieren und differenzieren zu

Osteoklasten. Durch die Fähigkeit der Osteoblasten, auf den RANK- Rezeptor zu wirken, können sie direkt Einfluss auf die Osteoklastenaktivierung nehmen (Hahn et al. 2008).

Die zellulären Bestandteile des Knochens sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet. Sie ist entscheidend für die Knocheneigenschaften verantwortlich und besteht zu etwa 35% aus einem organischen und zu etwa 65% aus einem anorganischen Anteil.

Die organische Matrix wird von Osteoblasten synthetisiert und besteht zu ca. 90% aus Kollagen Typ I. Weitere Anteile sind Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Knochensialoprotein, Thrombospondin u.a..

Die anorganische Matrix besteht aus Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) als kristalline Ablagerungsform des Kalziumphosphats. Die Regulation der Mineralisation ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass Proteine wie Osteonektin und Osteopontin eine Rolle spielen. Außerdem wird eine Mineralisation durch von Osteoblasten gebildete Apatit- Vesikel vermutet (Welsch 2006).

Makroskopisch lassen sich zwei Bauformen des Knochengewebes unterscheiden:

Kompakter Knochen (Substantia compacta) in der Peripherie als äußere Rindenschicht des Knochens und spongiöser Knochen (Substantia spongiosa) als dreidimensionales Trabekelnetzwerk im Inneren des Knochens.

Eine weitere makroskopische Unterscheidung erfolgt in Lamellenknochen und Geflechtknochen.

Sowohl die Kompakta, als auch die Spongiosa bestehen aus Lamellenknochen. Sein Aufbau steht in direkter Beziehung zu den Blutgefäßen. Um einen zentralen Knochenkanal (Havers-Kanal) finden sich zirkuläre Knochenlamellen und bilden ein Osteon. Zwischen den Knochenlamellen liegen die Osteozyten mit ihren Ausläufern. Die Havers- Kanäle und die Knochenmarkshöhle stehen über schräg verlaufende Volkmann- Kanäle in Verbindung (Junqueira und Carneiro 2002, Lüllmann- Rauch 2006).

Geflechtknochen findet man bei Knochenneubildungen, er imponiert als dreidimensionales Netzwerk aus Knochenbälkchen. Im Laufe der Knochenentwicklung wird Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt (Junqueira und Carneiro 2002).



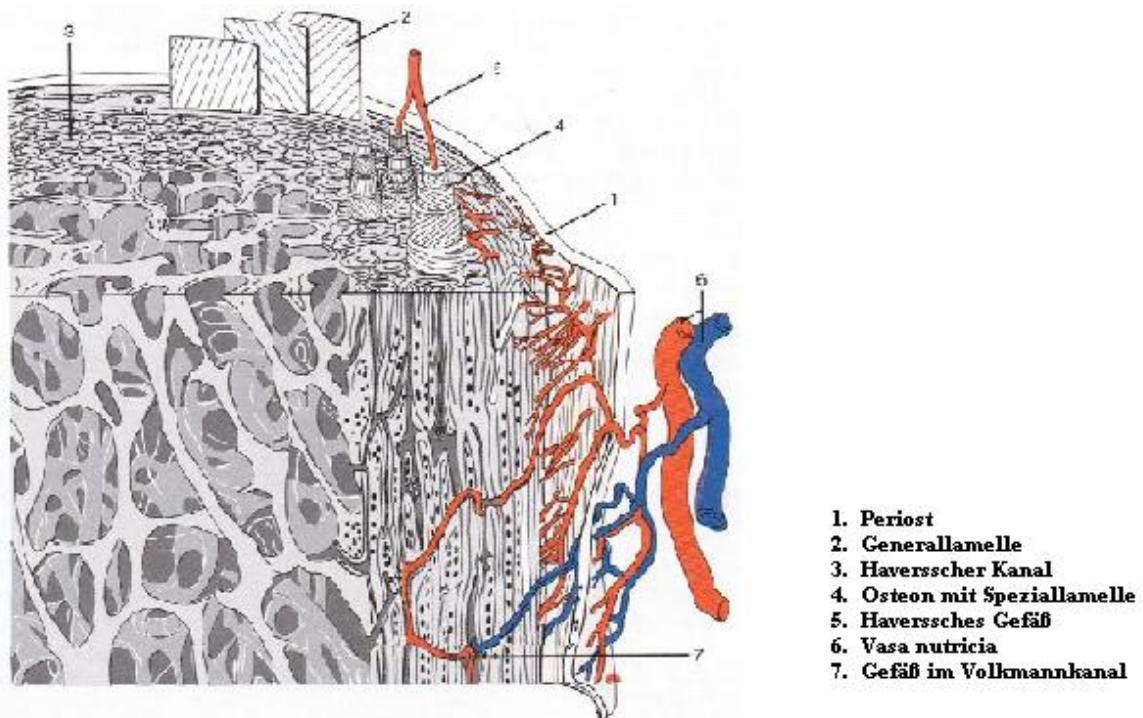


Abb.1 Schematische Darstellung des Lamellenknochens (Benninghoff und Drenckhahn 2008, S.135)

Wenn man die Knochenentwicklung betrachtet, muss man grundsätzlich zwei verschiedene Arten der Ossifikation unterscheiden: Eine Knochenbildung innerhalb oder um ein Knorpelgerüst herum (chondrale Osteogenese) und eine Knochenbildung, die direkt abläuft, ohne knorpeliges Gerüst (desmale Osteogenese).

Die chondrale Osteogenese (=indirekte Knochenbildung) überwiegt im Bereich der Extremitäten und der Schädelbasis. Bereits ab der 5. Embryonalwoche führen Mesenchymverdichtungen, in denen sich Chondroblasten differenzieren, zu der Entwicklung von hyalinem Knorpel. Die enchondrale Ossifikation der Diaphyse langer Röhrenknochen schreitet in Richtung der Knorpelenden fort. Durch die Ausbildung von Blutgefäßen können weitere mesenchymale Zellen, unter denen sich auch Osteoprogenitorzellen befinden, einwandern, zu Osteoblasten differenzieren, und in die Knochenbildung eingreifen.

Die desmale Osteogenese (=direkte Knochenbildung) verläuft nicht über die Bildung eines knorpeligen Substrates, sondern bringt direkt Knochengewebe hervor. Sie überwiegt in den flachen Deckknochen des Neurokraniums, des Viszerokraniums und der Klavikula.

Osteoblasten differenzieren sich direkt aus mesenchymalem Gewebe, und produzieren Osteoid, einen unverkalkten Vorknochen. Bei der anschließenden Verkalkung des Osteoids werden Osteoblasten eingemauert und differenzieren zu Osteozyten (Hahn et al. 2008).

### 1.1.2 Regulation des Knochenstoffwechsels

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das die Fähigkeit besitzt, auf mechanische Stimuli zu reagieren und zu adaptieren, indem Veränderungen der Masse, der Geometrie und der Stärke vorgenommen werden (Heinonen et al. 2001, Tanck et al. 2001).

Diese Umbaumaßnahmen dienen neben der Kompensation von Materialbeanspruchungen der Regelung und Homöostase des Kalzium- und Phosphathaushaltes. So bilden Osteoblasten und Osteoklasten als „*Basic Multicellular Units*“ Einheiten, die für den Knochenaufbau und Knochenabbau zuständig sind (Martin RB 2007).

Die Zusammensetzung und Strukturierung des Knochens unterliegt hormonalen, metabolischen und nutritiven Einflüssen, wobei ein geringer Gebrauch zur Atrophie führen kann. Durch eine gute Durchblutung sind Anpassungsvorgänge auf unterschiedliche Bedingungen und Regeneration des Gewebes gut möglich.

Mechanische Beanspruchung ist der wichtigste Faktor für den Erhalt der Knochensubstanz. Die hierfür ursächlichen Mechanismen sind noch nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich besitzen Osteozyten eine Funktion als Mechanosensoren, indem durch stressensitive Kalziumkanäle und Integrine parakrine Mediatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostacyclin und Stickstoffoxide an ruhenden Osteoblasten wirken (Harada und Rodan 2003).

Osteozyten können aber auch bei sehr starker oder auch bei fehlender Belastung in einen programmierten Zelltod (Apoptose) übergehen. So kann gleichzeitig eine zu starke Belastung oder eine fehlende Belastung zur Aktivierung von Umbaumaßnahmen der Knochensubstanz führen (Martin RB 2007).

Zusätzlich wird Knochenaufbau und Mineralisierung des Extrazellularraumes durch Konzentrationen von Kalzium-, Phosphat-, und H<sup>+</sup>- Ionen und durch Hormonkonzentrationen reguliert. Der Aufrechterhaltung des Kalzium- und Phosphathaushaltes kommt dabei eine wichtige Rolle zu. So werden bei sinkenden Kalziumkonzentrationen die Kalziumspeicher des Knochens über Parathormon mobilisiert. Zusätzlich wird die renale Phosphatrückresorption gehemmt und die Kalziumrückresorption gesteigert.

Außerdem wurde im Tierversuch gezeigt, dass über Stimulation der RANK-L- Expression und Hemmung der Osteoprotegerin- Produktion die Osteoklastenzahl erhöht wird (Hofbauer et al. 2004).

Eine Demineralisation der Knochensubstanz wird durch Kalzitriol (Vitamin-D-Hormon) verhindert. Es steigert die Kalzium- und Phosphataufnahme aus dem Darm und vermehrt die Rückresorption in der Niere. Durch diese Konzentrationszunahme wird die Mineralisierung des Knochens gefördert.

Das in den C- Zellen der Schilddrüse gebildete Kalzitinin wird bei hohen Kalziumkonzentrationen ausgeschüttet. Es steigert die Bildung von Kalzitriol und den Einbau

von Kalziumphosphat in den Knochen und vermindert die renale Kalzium- und Phosphat-Rückresorption.

Östrogen hemmt die Knochenresorption über Verminderung der Osteoklastenzahl. Man nimmt an, dass die Aktivierung des Östrogenrezeptors ER- $\alpha$  zu einer Steigerung des Faktors Osteoprotegerin führt (Hofbauer et al. 2004).

Testosteron kann durch das Enzym Aromatase in Östrogen umgewandelt werden und, wie bereits oben beschrieben, wirken, oder direkt die Knochenresorption hemmen (Harada und Rodan 2003).

Glukokortikoide führen sowohl zu einem Knochenabbau durch Stimulation von Osteoklasten, als auch zu einer verminderten Neubildung von Knochensubstanz (Canalis 1996). Auch Glukokortikoide können die Ausschüttung von Osteoprotegerin beeinflussen (Hofbauer et al. 2004).

Die Adenohypophyse wirkt über Somatomedin C (= *insulin-like-growth factor-1*) stimulierend auf osteoblastäre Zellen (Welsch 2006).

Eine andere Gruppe der Stoffe, die in die Wachstumsregulation eingreifen, bilden Wachstumsfaktoren wie BMP („*bone morphogenetic proteins*“). Hierbei handelt es sich um Proteine, die von Zellen produziert und sezerniert werden, um an einer Zielzelle als Signalmolekül zu wirken.

## 1.2 Knochenersatzmaterialien

### 1.2.1 Versorgung von Knochendefekten

Die Rekonstruktion von Knochendefekten infolge von Tumorleiden, kongenitalen Anomalien, Entzündungen und Trauma bedeutet nach wie vor ein großes Problem in der rekonstruktiven Chirurgie (Crane et al. 1995). Neben ästhetischen Einschränkungen führen Knochendefekte bei überschreiten einer „kritischen Größe“ (*Critical-Size-Defect*) zu einem Funktionsverlust des Gewebes, sodass es nicht zu einer spontanen, vom Körper selbst induzierten Heilung mehr kommen kann (Huh et al. 2005, Hollinger und Kleinschmidt 1990, Schmitz und Hollinger 1986). Damit die Kontinuität und mechanische Belastbarkeit des Knochens wiederhergestellt werden kann, stehen verschiedene Verfahren der Knochenrekonstruktion zur Verfügung. Neben einer Stabilisierung kann die Auffüllung des Defektes erforderlich sein, um die Regeneration zu verbessern. Für die Versorgung von Knochendefekten können verschiedene Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Funktionserfüllung, Dauerbeständigkeit und Biokompatibilität verwendet werden.

Grundsätzlich kommen biologische Transplantate oder synthetische Knochenersatzmaterialien zum Einsatz. Angestrebt wird eine schnelle und sichere Durchbauung der Kontinuitätsunterbrechung und somit eine Knochenheilung, die durch das Ersatzmaterial begünstigt werden soll. Ziel ist ein vitaler und belastungsfähiger Knochen zur Versorgung des Defektes.

Für Knochenersatzmaterialien bestehen allgemeine Anforderungen:

So müssen sie ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften im vitalen Milieu beibehalten, ohne zelluläre Toxizität zu induzieren, systemische Effekte zu bewirken, immunologische Abstoßungsreaktionen hervorzurufen oder mutagene Nebenwirkungen zu verursachen. Darüber hinaus soll Knochenersatz mechanisch belastbar, in Form und Größe flexibel, frei verfügbar und günstig in der Herstellung sein (Rueger 1992, Williams 1987). Man unterscheidet osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien (Bruder und Fox 1999):

- Osteogene Materialien beinhalten lebende Zellen (Osteoblasten oder osteoblastäre Vorläuferzellen), die die Fähigkeit besitzen, Knochen zu bilden.
- Osteokonduktive Materialien stellen eine Leitstruktur für Knochenbildung dar und unterstützen das Einwachsen der Zellen.
- Osteoinduktive Materialien stimulieren lokale Zellen zur osteoblastären Differenzierung.

Die Transplantation von autologem Knochengewebe im Gesichtsbereich gilt in der Versorgung von Knochendefekten als „Goldstandard“ (Moore et al. 2001, Gosain und Persing 1999, Cordeiro et al. 1999). Alternativen bilden allogene und xenogene Transplantate, sowie alloplastische Materialien.

### 1.2.2 Autologer Knochenersatz

Autologer Knochenersatz beschreibt die Verpflanzung vitalen Gewebes innerhalb eines Individuums. Man unterscheidet Spongiosatransplantate und Mono- bzw. Bikortikaltransplantate, jeweils vaskularisiert (Hidalgo 1991, Flemming et al. 1990) und nicht vaskularisiert (Jewer et al. 1989).

Vaskularisierte Transplantate und Spongiosatransplantate stellen nicht nur die Knochenmatrix, sondern enthalten auch vitale Zellen, und besitzen so neben osteokonduktiven und osteoinduktiven auch osteogene Eigenschaften (Bauer und Muschler 2000). Die Transplantation autologer Knochenanteile kann frei, gestielt und mikrochirurgisch revaskularisiert erfolgen. Als Entnahmestellen eignen sich für Spongiosatransplantate der Beckenkamm, die distale Speiche, das laterale Tuberkel des Schienbeins und der distale Teil des Schienbeins. Für kortikale Transplantate eignen sich das Wadenbein, Teile der

verknöcherten Rippen und der Beckenkamm (Finkemeier 2002). Außerdem wird in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Knochengewebe von intraoral verwendet.

Noch ist der autologe Knochenersatz in seiner biologischen Bedeutung allen alternativen Verfahren überlegen, da es sich bei dem Transplantat um körpereigenes Material handelt, und keine immunologischen Reaktionen entstehen (Gosain und Persing 1999). Neben weiteren Vorteilen des autologen Knochens, wie gutes und schnelles Einheilen, ergeben sich Nachteile hinsichtlich der zusätzlichen Belastung durch die verlängerte Operationszeit und Narkosedauer, sowie der erhöhten Morbidität des Patienten (durch Infektionen, Blutverluste, Schmerzen, Hämatombildung) und der begrenzten Verfügbarkeit von Knochensubstanz bei der Versorgung von großen Defekten (Gielkens et al. 2008, Klein et al. 2005, Shindo et al. 2000, Lenzen et al. 1999). Außerdem besteht durch den zweiten Eingriff die Gefahr der Verletzung anatomisch wichtiger Strukturen, bis hin zu Frakturen an der Entnahmestelle (Wippermann et al 1997).

### 1.2.3 Allogener Knochenersatz

Als eine Alternative zu autologem Knochenersatz gelten allogene Transplantate. Ihre Anwendung wurde bereits in Studien gezeigt (Dahlin et al. 1991, Hellem und Olofsson 1988, Sheen et al. 1988). Es handelt sich hierbei um Gewebe, welches von Individuen der gleichen Spezies stammt und neben einer immunologischen Reaktion des Empfängers auch die Übertragung infektiöser Erkrankungen, wie Hep C, HIV und TSE (*transmissible spongiform encephalopathy*) hervorrufen kann. Somit wurden Methoden entwickelt, um das gewonnene Gewebe aufzubereiten und zelluläre Anteile zu entfernen. Verwendet werden die chemische Behandlung mit Peressigsäure und Ethanol, die Sterilisation mit Gammastrahlen, die thermische Behandlung mit feuchter Hitze und das Tutoplast- Kombinationsverfahren (Katthagen et al. 2008, Endres et al. 2005). Die biomechanischen Eigenschaften sollen durch die Aufbereitung nicht verloren gehen (De Long et al. 2007). Neben einer je nach Bearbeitung geringen osteoinduktiven Komponente, leisten allogene Transplantate hauptsächlich Osteokonduktion (Endres et al. 2005). Durch teilweise lang dauernde Bearbeitungsschritte wird ein avitales Knochen transplantat geschaffen, ohne die Fähigkeit der Gewebeerneuerung, was eine Limitierung der Erfolgsrate bedeuten kann (Eppley et al. 2005). Im klinischen Gebrauch sind zahlreichen Nebenwirkungen beschrieben worden. So kann es zu Resorption durch Osteoklasten kommen. Außerdem wurden eine erhöhte Prävalenz von Mikrofrakturen, fehlende Einheilung, verminderte mechanische Stabilität und eine verminderte Knochendichte beobachtet (Schmidt- Rohlfig et al. 2009).

Durch den Verzicht auf Sterilisation der Transplantate können zwar vergleichbare Ergebnisse, wie bei autologem Knochenersatz erreicht werden, das Infektionsrisiko ist jedoch höher (Katthagen et al. 2008, Kainer et al. 2004, Lane et al. 1999).

In der Klinik kommen mittlerweile verschiedenen Präparate zum Einsatz. So verwendet man demineralisierte Knochenmatrix, die mit Zusatz autologer Spongiosa größere Defekte versorgen kann (z.B. Grafton® und DynaGraft DBM®) (Finkemeier 2002).

#### 1.2.4 Xenogener Knochenersatz

Xenogene Materialien werden aus unterschiedlichen Spezies gewonnen. Verwendet werden Materialien koralinen, bovinen und equinen Ursprungs.

Bovine Xenotransplantate sind bereits eine allgemein bekannte Quelle für den natürlichen Knochenersatz (Sogal und Tofe 1999). Es handelt sich überwiegend um deproteinisierten spongiösen Knochen, er gehört der Gruppe der Hydroxylapatit- Keramiken an.

Knochenwachstum erfolgt in den Matrixzwischenräumen, so ermöglicht diese Form des Knochenersatzes Osteokonduktion (Schwartz et al. 2000). Eine Resorption bleibt dabei aus (Hallman et al. 2001), sodass unter klinischen Bedingungen eine Knochenregeneration erreicht werden kann, weshalb xenogener Knochenersatz auch als biokompatibles Füllmaterial bezeichnet wird (Artzi et al. 2001).

Prominenter Vertreter dieser Gruppe, besonders bei kleineren oralen Knochendefekten, ist das bovine Knochenersatzmaterial Bio-Oss®. Felice et al. zeigten, dass sich bei vertikalem Knochenaufbau eines atrophischen Kiefers mit diesem Knochenersatzmaterial histomorphometrisch und histologisch in Bezug auf Prothesen-Defekte, Implantat-Defekte, biologische und prothetische Komplikationen und Peri-Implantat-Knochengehalt genauso gute Ergebnisse erzielen lassen, wie mit autologem Knochen, bei geringerer Invasivität (Felice et al. 2009).

Eine andere Quelle für xenogene Transplantate bieten Meereskorallen. Biocoral®, ein Material aus Kalziumkarbonat, konnte bereits gute Eigenschaften bei der Versorgung von segmentalen Knochendefekten zeigen (Gao et al. 1997).

Da es sich bei xenogenem Knochenersatz jedoch grundsätzlich um körperfremdes biologisches Material handelt, kann die Gefahr von Infektionsübertragungen und immunologischen Reaktionen nicht ausgeschlossen werden. Auch xenogene Transplantate müssen aufwendige Reinigungsverfahren durchlaufen, um eine mögliche Übertragung von Infektionen zu vermeiden sowie fehlende genetische Kompatibilität zwischen Spender- und Empfängergewebe auszugleichen (Katthagen et al. 2008, Eppley et al. 2005, Endres et al. 2005, Kainer et al. 2004).

---

### 1.2.5 Alloplastischer Knochenersatz

Alloplastische Materialien, wie keramische Werkstoffe und bioaktive Gläser, sind anorganische, synthetische und biokompatible Knochenersatzmaterialien.

Biokompatible keramische Werkstoffe und bioaktive Gläser sind Stoffe, die nach Implantation an den Knochen anwachsen. Resorbierbare Stoffe werden sogar komplett von körpereigenem Gewebe ersetzt (Lane et al. 1999).

Keramische Werkstoffe bestehen hauptsächlich aus Kalziumphosphat. Die zwei häufig verwendeten Materialien sind Trikalziumphosphat und Hydroxylapatit. Sie besitzen eine gute Druckfestigkeit, zeigen jedoch Schwächen bei Zugbeanspruchung und Stoßbeanspruchung (Moore et al. 2001). Sie dienen als biologische Füllmaterialien, die durch Resorptionsvorgänge den Ersatz durch körpereigenes Knochengewebe ermöglichen (Hashimoto- Uoshima et al. 1995). Dieser Vorgang des Gewebeaustausches ist jedoch schwer vorherzusagen und die Resorption des Materials kann entweder zu einem Zeitpunkt stattfinden, zu dem noch nicht genügend Knochenvolumen vorhanden ist, oder das Material resorbiert zu langsam (Hollinger et al. 1996).

Bioaktive Gläser bilden eine Doppelschicht von Siliziumgel und Kalziumphosphat aus, wenn sie mit Blut in Kontakt kommen. Kollagen und Proteine aus der Umgebung des Knochens werden inkorporiert und vermitteln eine direkte chemische Bindung (Hench und Wilson 1984). Es wird angenommen, dass diese Eigenschaft die Osteogenese fördert, und Knochenbildung beschleunigt (Moore et al. 2001).

Insgesamt bietet alloplastischer Knochenersatz hauptsächlich osteokonduktive Eigenschaften bei schlechtem osteoinduktiven oder osteogenen Potential.

Obwohl bereits unterschiedliche Materialien untersucht wurden, ist es bisher nicht gelungen ein Knochenersatzmaterial zu schaffen, das den aktuellen Anforderungen gerecht wird. Im klinischen Alltag nehmen Komposite bei der Versorgung von Knochendefekten eine immer wichtigere Stellung ein. Sie verbinden autologe, allogene und synthetische Materialeigenschaften (Rueger 1998).

Unter Berücksichtigung der derzeitigen Risiken und Limitationen in Bezug auf die Heilungspotenz, bietet das Tissue Engineering von Knochengewebe neue Möglichkeiten bei der Versorgung von Knochendefekten mit in vitro gezüchteten artifiziellen autologen Knochenersatzmaterialien.

---

## 1.3 Tissue Engineering

### 1.3.1 Grundlagen

Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieurs- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes, sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen (Nerem 1992). Der Austausch von körpereigenen Organfunktionen und lebendigem Gewebe durch künstlich hergestellte Ersatzmaterialien stellt eine der bedeutsamsten wissenschaftlichen Herausforderungen in der biomedizinischen Forschung dar (Lysaght und Reyes 2001). Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde ursprünglich von Wolter und Meyer im Jahr 1984 benutzt, und gilt gegenwärtig als ein sich schnell entwickelndes Wissenschaftsfeld im Bereich der Biomedizin (Wolter und Meyer 1984). Bruder und Fox (1999) fassten die drei Methoden zusammen, die sich im Tissue Engineering von Knochen in den vergangenen Jahren durchgesetzt und etabliert haben (Bruder und Fox 1999). Für die Züchtung von künstlichem Knochengewebe verfolgt man ein Konzept der Knochenregeneration, bestehend aus einem Trägermaterial als Leitstruktur, einer Zellpopulation und Wachstumsfaktoren (Schmidt- Rohlfig et al. 2009). So sollen Zellen von einer kleinen Biopsie isoliert, in der Zellkultur expandiert und anschließend auf Trägermaterialien besiedelt werden. Es erlaubt die Herstellung von Zelltransplantaten, bestehend aus geeigneten Biomaterialien mit darin integrierten autologen Zellen. Kombiniert mit einer kontrollierten Zugabe von Wachstumsfaktoren fördern diese Zelltransplantate die Entwicklung neuen Ersatzgewebes für die Regeneration von pathologisch verändertem Gewebe (Sittinger et al. 1996). Ziel ist das Erreichen einer möglichst hohen Anzahl von Zellen in der Besiedelung und einer möglichst gleichmäßigen Verteilung im Trägermaterial, um die Grundlage dafür zu schaffen, einen homogenen Knochen zu züchten (Wendt et al. 2003, Holy et al. 2000) und die Regeneration von funktionstüchtigem Gewebe zu gewährleisten (Muschler et al. 2004). So kann durch Tissue Engineering gewonnenes Material dazu dienen, funktionelle Eigenschaften von nativem Gewebe zu übernehmen (Langer und Vacanti 1993).



---

### 1.3.2 Zellpopulation

#### 1.3.2.1 Adulte Stammzellen

Lange Zeit galt die Annahme, dass adulte Stammzellen bezüglich Differenzierung und Regeneration auf das Gewebe beschränkt sind, dem sie entstammen. Diese starre Betrachtungsweise wird durch neuere Untersuchungen jedoch immer unwahrscheinlicher. So konnte gezeigt werden, dass Stammzellen aus dem Knochenmark zur Erneuerung von Muskelgewebe (Ferrari et al. 1998), Gehirn (Mezey et al. 2000), Leber (Lagasse et al. 2000) und Herz (Orlic et al. 2001) beitragen. Besonders in den letzten Jahren zeigten viele Studien eine bis dahin nur postulierte Fähigkeit zur Formveränderung adulter Stammzellen (Alison et al. 2004, De Bari et al. 2003), sodass die Hoffnung zur therapeutischen Anwendung dieser Zellgruppe geweckt wurde.

#### 1.3.2.2 Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Friedenstein zeigte bereits 1966, dass Knochenmarkstromazellen, die in ein geschlossenes System (z.B. eine Diffusionskammer) transplantiert werden, Knochengewebe bilden können und eine Adhäsion auf Kunststoffoberflächen zeigen (Friedenstein et al. 1968, Friedenstein et al. 1966). Andere Forschergruppen wiesen die Fähigkeit dieser Zellen nach, in verschiedene mesenchymale Zelllinien differenzieren zu können (Bab et al. 1986, Ashton et al. 1980, Castro-Malaspina et al. 1980). Das mögliche therapeutische Potential humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) hat besonders in den letzten zwei Jahrzehnten ein enorm wachsendes Interesse und eine Vielzahl von Studien und Untersuchungen auf allen Gebieten der klinischen, biologischen und biotechnologischen Forschung hervorgerufen (Horwitz et al. 2005), und gewinnt in der Regeneration von Organen und Geweben immer mehr an Bedeutung (Kolb und Holler 1997). Unser Wissen über hMSC basiert größtenteils auf Studien von in vitro kultivierten Zellen, die Eigenschaften der Zellgruppe in vivo sind jedoch weitgehend unbekannt (Ohishi und Schipani 2010). hMSC sind in verschiedenen Geweben enthalten, so findet man sie im Blut (Zvaifler et al. 2000), Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Hautgewebe (Chunmeng und Tianmin 2004), Knochenmark (Sottile et al. 2002), fetalen Blut, Lebergewebe und Lungengewebe (Jackson et al. 2007, In't Anker et al. 2003). Stammzellen aus dem Knochenmark scheinen das höchste Differenzierungspotential zu besitzen, und sind somit am besten zur therapeutischen Anwendung geeignet (Friedenstein et al. 1968). Die vielfältige Differenzierungspotenz hMSC konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. So konnten neben mesodermalen Zelltypen (Osteoblasten, Chondrozyten)

(Pittenger et al. 1999) und Adipozyten (Justesen et al. 2002) auch nicht mesodermale Zelltypen (Jiang et al. 2002, Zhao et al. 2002) nachgewiesen werden.

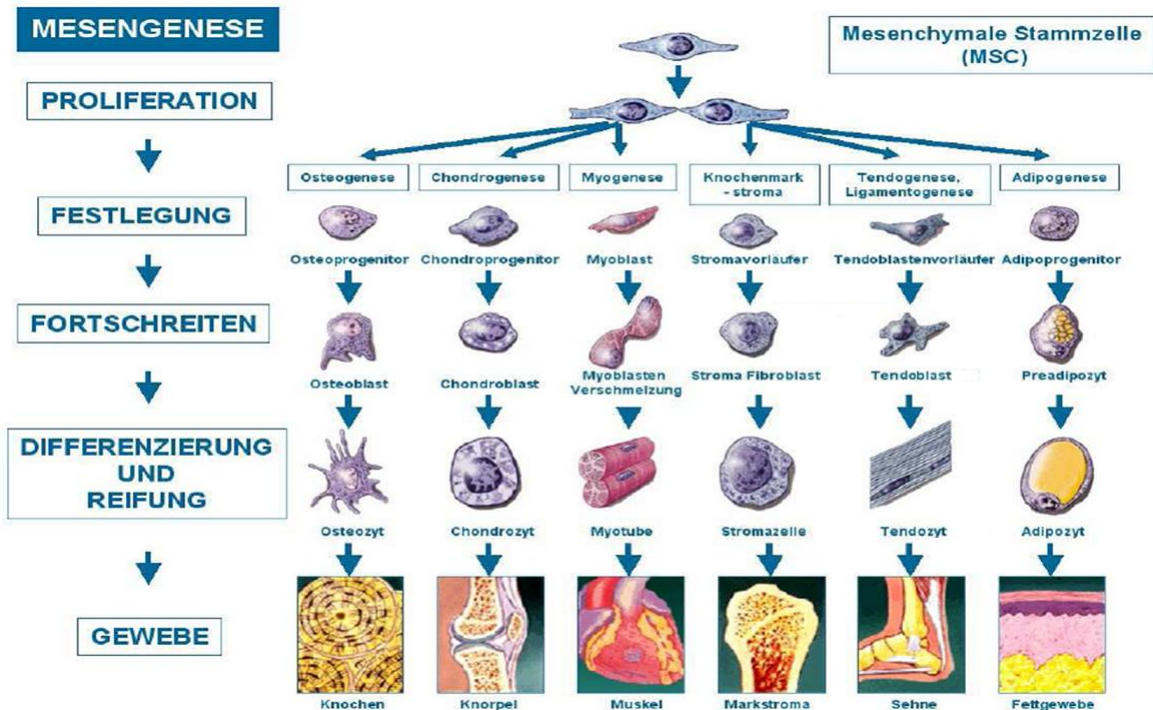


Abb. 2: Modell der Mesengese (Caplan und Bruder 2001, S. 260)

Zur Isolierung und Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen sind verschiedene Oberflächenmarker beschrieben worden, die von mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden, wie beispielsweise CD90, CD106, CD29, CD166, CD44, CD73, CD 105 und Stro-1 (Chamberlain et al. 2007, Phinney und Prockop 2007).

Die „International Society for Cellular Therapy (ISCT)“ hat Kriterien aufgestellt für die Identifizierung von Knochenmarkszellen als hMSC: So müssen Zellen neben Eigenschaften wie multiple Differenzierungsfähigkeit und Adhäsion an Kunststoffoberflächen für CD73, CD90 und CD105 positiv sein, bei fast fehlender (<2%) Expression von CD45, CD34, CD14, CD 19 und HLA- DR (Dominici et al. 2006).

Obwohl die Anzahl von humanen mesenchymalen Stammzellen mit dem Alter abnimmt (Caplan 2007), machen die Verfügbarkeit einer großen Zellzahl durch Kultivierung und das hohe Potential für Differenzierung MSC zu einer guten Quelle für das Tissue Engineering (Caplan und Bruder 2001, Abb. 2).

### 1.3.2.3 Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Die Differenzierung und die Regulation des Wachstums mesenchymaler Stammzellen werden nach wie vor intensiv erforscht. Die osteogene Differenzierung ist in verschiedenen Studien untersucht worden (Haynesworth et al. 1992, Beresford 1989). Nach Kultivierung und Beimpfung mit Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat zeigen MSC deutliche Veränderungen: Sie nehmen eine kubische Form an, zeigen eine erhöhte Aktivität für Alkalische Phosphatase und exponieren osteoblastäre Oberflächenmarker. Außerdem synthetisieren sie Osteokalzin und lagern mineralisierte Matrix extrazellulär ab (Niemeyer et al. 2004, Jaiswal et al. 1997).

So entwickeln sich mesenchymale Stammzellen über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten zu matrixproduzierenden Osteoblasten (Abb. 3).

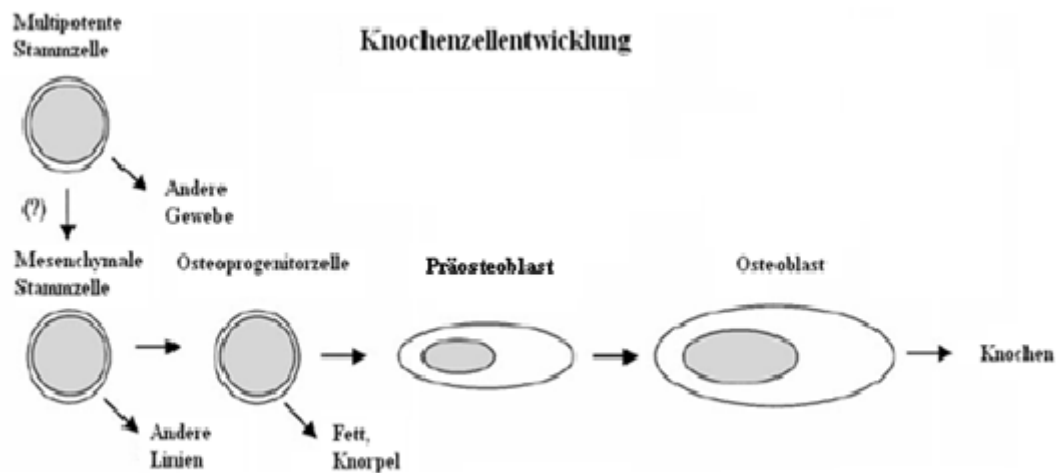


Abb.3 Knochen Zellpopulation (Long 2001, S. 678)

Die Koordination der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten ist ein komplexer Prozess, der von zahlreichen stimulierenden und inhibierenden Faktoren gesteuert wird. Der Differenzierungszyklus zeigt eine Phase der Proliferation, eine Phase der Matrixbildung und eine Phase der Mineralisation.

Dieses In-Vitro-Differenzierungsmodell (Abb.4) mit zeitlicher Expression bestimmter Markergene nach Owen entstand aus Untersuchungen an fötalen Rattenkalvarien (Owen et al. 1990) und konnte in verschiedenen Zellkulturmodellen nachgewiesen werden (Aubin 1998; Lian und Stein 1995; Mayer et al. 1992).

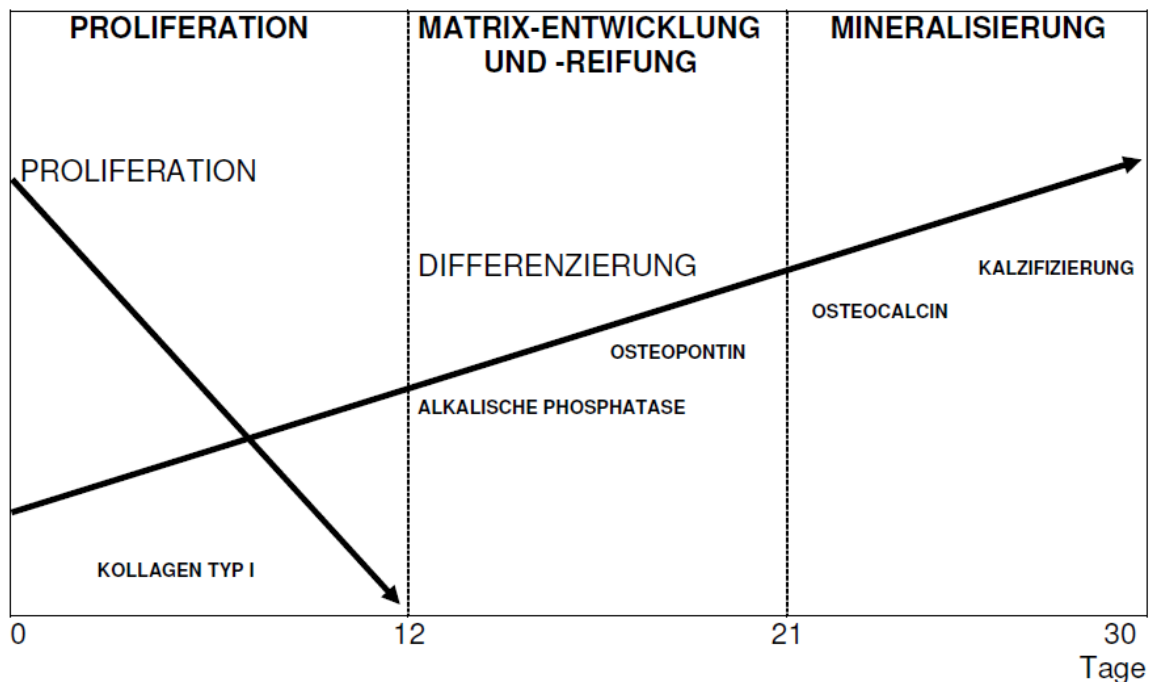


Abb. 4 Modell der Genexpression während der Osteoblastendifferenzierung (Owen et al. 1990, S. 428)

Die osteoblastäre Differenzierung wird *in vitro* über den Nachweis osteoblastärer Marker getroffen. Das bedeutet zum einen die Messung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase, und zum anderen die Messung von Kollagen I, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Osteocalzin (Bruder et al. 1997, Aubin 1998).

### 1.3.3 Zellkultivierung

Schon seit die Zelle als Baustein des Organismus identifiziert wurde, bemühten sich Forscher um deren Kultivierung. Die Zellkultivierung, die heute angewandt wird, ist eine seit mehr als 50 Jahren kaum veränderte Technik und hat bis heute auch nicht an Bedeutung verloren. Es gelang damals, embryonale Zellen über einen relativ langen Zeitraum in Kultur zu halten. Unter sehr guten Bedingungen gelang auch die Entwicklung von Zellen zu Gewebestrukturen (Minuth 1991).

Die Herstellung von Ersatzmaterialien zur Rekonstruktion von Knorpel- und Knochenstrukturen auf dem Gebiet der rekonstruktiven Chirurgie ist ein wichtiges Einsatzgebiet der Zellkulturen. So können aus kleinsten am Patienten gewonnenen Biopsien, gewebeproduzierende Zellen gewonnen und kultiviert werden, um sie anschließend auf Trägermaterialien (*Scaffolds*), die als extrazelluläre Matrix dienen, anzuzüchten (Sittinger et al. 1996). Obwohl die aus autologer Quelle stammenden Zellen zahlenmäßig limitiert sind, ist es durch Techniken der Zellkultivierung möglich geworden, mesenchymale Stammzellen aus

dem Knochenmark zu vielfältigen und somit dem Tissue Engineering eine genügende Anzahl von Zellen zur Verfügung zu stellen (Minuth et al. 2000).

Dabei ist es wichtig einen Mediaustausch durchzuführen, um nicht nur die Zellen zu ernähren, sondern auch um Stoffwechselprodukte der Zellen, die bei einer Akkumulation zellschädigend wirken können, zu entfernen (Minuth et al. 1998). Zusätzlich können dem Kulturmedium auch Wachstumsfaktoren beigefügt werden, wie zum Beispiel fötales Kälberserum oder patienteneigenes Serum (Weiser et al. 1999).

#### 1.3.4 Biomaterialien als Träger für 3D-Zellkulturen

Gewebe umfasst neben zelluläre Strukturen eine extrazelluläre Matrix, die als dreidimensionales Gerüst eine gewebespezifische Umgebung bietet und Reservoirfunktion übernehmen soll. Biomaterialien als Träger für Zellkulturen müssen diese Funktion temporär imitieren.

Eine Reihe von In-Vitro-Modellen wurde untersucht, um eine ideale Umgebung für die Zellen zu schaffen und sich den Bedingungen in vivo anzunähern. Zunächst versuchte man 2D-Träger als Leitstruktur für Gewebeexpansion (Westbroek et al. 2000, Sakai et al. 1998, Glansthig et al. 1996, Neidlinger-Wilke et al. 1994, Brighton et al. 1991, Murray und Rushton 1990). Da ein Trägermaterial in seinen Eigenschaften und seiner Struktur der natürlichen Matrix, die es ersetzen soll, so ähnlich wie möglich sein sollte (Stock und Vacanti 2001), können diese Bedingungen jedoch nur bedingt ein adäquates Umfeld für das Wachstum der Zellen schaffen, sodass sich am geeignetsten ein poröses dreidimensionales Trägermaterial in Kombination mit Zellen und Wachstumsfaktoren erwiesen hat, um eine bestmögliche Annäherung an die Umgebung in vivo zu bieten (Trojani et al. 2005, Muschler et al. 2004, Botchwey et al. 2003, Martin I et al. 2001, Dong et al. 2001, Burger und Klein-Nulend 1999, Laurencin et al. 1996).

Um das Überleben von transplantierten Zellen zu ermöglichen, sollten gewisse Voraussetzungen erfüllt sein, die an das Trägermaterial gestellt werden.

Das Material muss so beschaffen sein, dass Zellen an der Oberfläche adhäreren können, um Proliferation und Differenzierung zu ermöglichen. Außerdem soll es biokompatibel sein, ohne eine Fremdkörperreaktion zu verursachen. Degradation und Resorption müssen möglichst synchron zur Gewebeneubildung stattfinden, bei einer bestmöglichen mechanischen Stabilität (Hutmacher 2000).

Darüber hinaus sollte die Architektur eines idealen Trägermaterials ein Höchstmaß an Porosität besitzen, bei Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften mit interkonnektierten Poren von etwa 200- 400 µm (Boyan et al. 1996), um eine genügend

große Oberfläche für Zelladhäsion und Zellwachstum zu schaffen, und trotzdem ausreichend Freiraum zu bieten, um Knochenwachstum und Gefäßsprossung zu ermöglichen, sowie die Nährstoffversorgung zu gewährleisten.

Für das Tissue Engineering von Knochen wurde eine große Anzahl von natürlichen und synthetischen Trägermaterialien untersucht. Verwendet werden Keramiken, Metalle, Polymere und Kombinationen aus diesen (Yang et al. 2001).

Keramiken werden häufig in der knochenregenerativen Medizin eingesetzt (LeGeros 2002, Vacanti et al. 2001). Sie können natürlicher (z.B. koralline Hydroxylapatite) oder synthetischer Natur (z.B. synthetisches Hydroxylapatit oder  $\beta$ - Trikalziumphosphat) sein (LeGeros 2002). Korallen besitzen eine gute Biokompatibilität, eine interkonnektierte poröse Struktur und geeignete mechanische Eigenschaften (Vacanti et al. 2001).

Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat ermöglichen beide Knochenwachstum, wobei Hydroxylapatit stärker die Osteogenese fördert, während Trikalziumphosphat schneller resorbiert wird. (Temenoff und Mikos 2000). Grundsätzlich zeigen die meisten Keramiken jedoch entscheidende Nachteile: Zum einen fehlt vielen keramischen Stoffen die Möglichkeit der Degradation in biologischer Umgebung und zum anderen sind ihre Verarbeitungsmöglichkeiten limitiert (Yang et al. 2001). Außerdem sind Keramiken oft brüchig bei mangelnder mechanischer Stabilität. Zusätzlich lässt sich Ihre Degradation nicht sicher vorhersagen (Adams et al. 2001). Alternativ können natürliche oder synthetische Polymere verwendet werden. Natürliche Polymere umfassen Kollagen, Fibrin, Chitosan, Stärke, Hyaluronsäure und Polyhydroxybutyrate. Ein wesentlicher Vorteil ist das geringe immunogene Potential, die chemische Einsatzflexibilität und die Fähigkeit, mit dem Empfängergewebe zu interagieren (Salgado et al. 2004).

Synthetische Polymere, wie zum Beispiel Copolymere (PLGA) bestehend aus Polylactidacid (PLA) und Polyglycolicacid (PGA) sind wegen ihrer kontrollierten Degradation und ihren mechanischen Eigenschaften weitverbreitete Materialien. Weitere Polymere, die für das Tissue Engineering von Knochen eine Anwendung finden, sind Polyanhydride, Polycarbonate, Polycaprolactone und Polyfumarate (Liu und Ma 2004). Wenn Polymere mit Keramiken zu Kompositen kombiniert werden, können mechanische und osteokonduktive Eigenschaften verbessert werden (Hutmacher et al. 2007).

### 1.3.5 Wachstumsfaktoren

Knochen ist ein von Wachstumsfaktoren abhängiges Gewebe. So ist es für das Tissue Engineering von Knochengewebe erforderlich, osteoinduktive Faktoren zu verwenden, vor allem bei der Besiedlung osteokonduktiver Trägergerüste durch mesenchymale Stammzellen

(Clarke et al. 2007). Wachstumsfaktoren sind polypeptidische Signalmoleküle, die von Zellen sezerniert werden und eine Reihe von Zellfunktionen unterstützen und regulieren. Sie binden parakrin und autokrin an spezifische Rezeptoren der Zielzelle und lösen eine Antwortreaktion aus (Rassow et al. 2008).

Für das Tissue Engineering von Knochen wurden eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren untersucht, um Zellproliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten zu verbessern. Häufig verwendete Vertreter sind (Schliephake 2009):

1. VEGF      *Vascular endothelial growth factor*
2. PDGF      *Platelet-derived growth factor*
3. bFGF      *Basic fibroblast growth factor*
4. IGF        *Insulin-like growth factor*
5. TGF- $\beta$     *Transforming growth factor beta*
6. BMPs      *Bone morphogenetic proteins.*

*Vascular endothelial growth factor* (VEGF) regt die endotheliale Zellproliferation und Migration an, induziert Vasodilatation und reguliert Angiogenese. Peng et al. zeigten, dass VEGF alleine zwar nicht die Knochenregeneration verbessert, jedoch in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren synergistisch die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen steigert und so die Bildung von Knochengewebe fördert (Peng et al. 2002).

*Platelet-derived growth factor* (PDGF) wird von Thrombozyten sezerniert. Es besitzt neben einer chemotaktischen Wirkung auf Osteoblasten, einen proliferativen Effekt für undifferenzierte Zellen mesenchymalen Ursprungs und ist somit ein wichtiger Mediator für die Heilung und das Remodelling von Knochengewebe. In Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren kann PDGF Knochenregeneration fördern, ohne selbst osteogene Eigenschaften zu besitzen (Schliephake 2002).

*Basic fibroblast growth factor* (bFGF) ist ein Wachstumsfaktor, der Knochenheilung durch Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beschleunigt und vaskuläre Regeneration begünstigt (Guo et al. 2006).

*Insulin-like growth factor* (IGF) fördert grundsätzlich fötale und postnatale Wachstums- und Entwicklungsvorgänge (Schliephake 2002). Außerdem stimuliert IGF die Mitose und die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen, und erhöht somit die Anzahl der verfügbaren Osteoblasten (Spencer et al. 1991).

*Transforming Growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) und *Bone morphogenetic proteins* (BMPs) gehören der *transforming growth factor- $\beta$*  Superfamilie an (Babensee et al. 2000).

TGF- $\beta$  hat verschiedene Effekte, die zur Matrixbildung und Ossifikation führen. So werden Osteoprogenitorzellen rekrutiert, die für die Knochenbildung erforderlich sind. Außerdem

wirkt TGF- $\beta$  mitogen auf Fibroblasten, was besonders in der initialen Phase des Knochenaufbaus wichtig ist (Centrella et al. 1991). Zusätzlich kann TGF- $\beta$  die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von Osteoklasten hemmen (Chenu et al. 1988), um die Ausbildung netzförmiger Knochenformationen zu ermöglichen. Die Produktion von Proteinen, wie Kollagen I (Centrella et al. 1992), Osteonektin und Osteopontin (Centrella et al. 1991) wird durch TGF- $\beta$  gesteigert, die von Osteokalzin eher vermindert (Centrella et al. 1991), um die Mineralisation der extrazellulären Matrix zu ermöglichen. Abgesehen von den direkten Effekten, kann TGF- $\beta$  indirekt über Induktion von VEGF Knochenwachstum fördern (Saadeh et al. 1999).

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) wirken je nach Dosierung unterschiedlich. Geringe Konzentrationen führen zu Chemotaxis und Zellproliferation, hohe Konzentrationen fördern Zelldifferenzierung und Knochenbildung (Urist 1997). BMPs stimulieren die osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und die Proliferation von Osteoblasten (Sikavitsas et al. 2001), wobei BMP 2, 4, 6 und 7 (OP-1 Gruppe) die größte osteoinduktive Potenz aufweist (Schmidt- Rohlfig et al. 2009). Außerdem stimulieren BMPs die Produktion von Osteoprotegerin, einem Rezeptor von Osteoblasten, der Differenzierungsfaktoren für Osteoklasten bindet, und so die Reifung von Osteoklasten inhibiert (Wan et al. 2001).

### 1.3.6 Besiedlung

Für das Tissue engineering ist die Optimierung der Besiedlung von Zellen auf das Trägermaterial besonders wichtig und bedeutet nach wie vor eine Herausforderung. Die Anforderungen, die hieran gestellt werden, beinhalten (Vunjak-Novakovic et al. 1998):

- Eine hohe Anzahl an Zellen, um die Kapazität der Besiedlung zu maximieren.
- Eine hohe kinetische Rate, um die Zeit der Zellen in Suspension zu minimieren.
- Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Trägermaterial als Basis eines gleichmäßig wachsenden Gewebes.

Darüber hinaus ist die Versorgung der Zellen nach Anheftung an die Oberfläche des Trägers von großer Bedeutung. Der Transport von niedermolekularen Metaboliten, Abfallprodukten und anderen Makromolekülen ist in erster Linie von Diffusion und Konvektion abhängig, verursacht von Konzentrationsgefällen und konvektiven Kräften in Form von „*fluid Flow*“ (Grodzinski et al. 2000). Ohne „*fluid Flow*“ ist Diffusion die einzige Möglichkeit des Stoffaustausches. Nach einer bestimmten Zeit kommt es zur Minderversorgung der Zellen, und vereinzelt zu Migration vermittelt durch chemotaktische Mechanismen hin zu Orten, wo die Nährstoffversorgung besser ist. Die zurückgebliebenen Zellen zeigen verminderte Differenzierung und geringere Expression von osteogenen Markern (Glowacki et al. 1998).



---

Um die Nährstoffversorgung der Zellen zu verbessern und eine homogene Besiedlung des Trägermaterials mit Zellen zu ermöglichen, sind verschiedenen Arten von Bioreaktoren entwickelt worden (Vunjak-Novakovic et al. 2005).

Eine Möglichkeit bieten *Spinner-Flasks*. Dabei hängen die Träger an Nadeln befestigt vom Deckel eines Kolben und werden kontinuierlich von Medium umspült. Hierfür sind konvektive Kräfte verantwortlich, die durch einen Rührstab erzeugt werden. Jedoch rufen diese *Spinner Flasks* Turbulenzen, und somit eine ungleiche Verteilung von Scheerkräften über der Oberfläche der Träger hervor, womit Zellzerstörung begünstigt werden könnte (Vunjak-Novakovic et al. 1998).

Eine weitere Alternative ist der *Rotating-Wall-Vessel-Reactor*. Hierbei handelt es sich um zwei konzentrisch angeordnete Zylinder, auf denen Trägermaterialien befestigt werden können. Flächenförmiger Fluss minimiert mechanischen Stress für die Zellen im Konstrukt (Botchwey et al. 2001, Schwarz et al. 1992).

Einen anderen Ansatz zur Verbesserung einer gleichmäßigen Besiedlung verfolgen Unterdruck- und Vakuum-Systeme (Wang et al. 2006, Solchaga et al. 2006). So konnte gezeigt werden, dass in zentrumsnahen Regionen Luftblasen im Trägermaterial gefangen bleiben, wodurch die Zellbesiedlung gestört und das Anheften von Zellen in zentralen Regionen verhindern wird. Die Entfernung dieser Luftblasen ermöglicht eine homogenere Besiedlung auch in zentrumsnahen Bereichen (Solchaga et al. 2006).

Grundsätzlich zeigen dynamische Besiedlungsmethoden die Eigenschaft, den Nährstofftransport zu verbessern, jedoch fehlt diese technische Unterstützung nach Implantation des besiedelten Trägermaterials in den lebenden Organismus. So ist es notwendig eine Besiedelungstechnik zu entwickeln, die auch unter statischen Bedingungen eine homogene Zellverteilung in den Trägern aufweist. Bei der dreidimensionalen Besiedlungen bleibt nur ein Teil der eingesetzten Zellen im Träger haften. Die restlichen Zellen adhären nicht an der Gitterstruktur des Trägers, sondern sammeln sich am Boden der Kulturflasche. Dieser Umstand kann durch die Verwendung einer Fibrin-Matrix gemindert werden, ohne die Proliferation und Migration von Zellen zu behindern.

Zhu et al. zeigten bereits, dass die Effizienz der Besiedlung und die gleichmäßige Zellverteilung auch im Zentrum von dreidimensionalen Kalziumkarbonat-Trägern mit einer Fibrinbeschichtung deutlich gesteigert werden kann, im Vergleich zur Besiedelung ohne Fibrin (Zhu et al. 2010).

---

## 1.4 Aufgabenstellung

Knöcherne Defekte bedeuten nach wie vor ein großes Problem im klinischen Alltag, wobei die Relevanz mit der zunehmend älter werdenden Bevölkerung steigen wird. Die bisher eingesetzten Methoden zur Versorgung von Gewebeverlust des knöchernen Systems weisen oft gravierende Einschränkungen auf, weshalb die In-Vitro-Züchtung künstlichen Knochens neue Möglichkeiten liefern kann.

Bei der Kultivierung von dreidimensionalen Trägermaterialien kommt es vor allem auf die Optimierung der Besiedelung von Zellen an, um eine homogene Verteilung und kontinuierliche Durchbauung zu erreichen. Dabei kann die Weiterentwicklung von statischen Besiedlungsmethoden dabei helfen, eine Überführung in eine In-Vivo-Situation zu erleichtern.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Fibrin Matrix neben der bereits bekannten Verbesserung der Besiedlungseffizienz auch einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von humanen Knochenmarkstromazellen (hBMSC) in Kalziumkarbonat-Trägermaterialien ausübt. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die Darstellung von Differenzierungsvorgängen im Trägermaterial durch Fluoreszenzmikroskopie und optisches Schneiden (ApoTome®) möglich ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Laborausstattung

#### 2.1.1 Zellkultur

Eismaschine:	Sanyo Tiefkühlschrank Bantorfer Straße 6 D-31542 Bad Nenndorf <a href="http://www.sanyo-biomedical.de">www.sanyo-biomedical.de</a>	Pipetten:	Eppendorf Peter-Henlein-Straße 2 D-50389 Wesseling-Berzdorf <a href="http://www.eppendorf.de">www.eppendorf.de</a>
Mikroskopie:	Carl Zeiss Vision GmbH Axiovert Zeppelinstraße D-85399 Hallbergmoos <a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a>	Pipettenspitzen und Röhrchen:	Sarstedt AG & Co Postfach 1220 D-51582 Nümbrecht <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a>
ApoTome <sup>®</sup> :	Carl Zeiss Vision GmbH Axiovert Zeppelinstraße 4 D-85399 Hallbergmoos <a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a>	Biocoral:	Biocoral, Inc. 12-14, rue Raymond Ridet F-92250 La Garenne Colombes <a href="http://www.biocoral.com">www.biocoral.com</a>
Sterilbank:	Biohazard Cleanair En12469 Kuipersweg 37 D-3449 JA Woerden <a href="http://www.cleanairbv.nl">www.cleanairbv.nl</a>	Kulturflaschen:	Greiner bio-one GmbH Rosenkamper Str. 6 D-42719 Solingen <a href="http://www.gbo.com">www.gbo.com</a>
Zellkulturinkubat.:	Sanyo Electric Biomedical CO.,Ltd,Japan Ewald Innovationstech. GmbH-Vertrieb Bantorfer Straße 6 D-31542 Nenndorf <a href="http://www.sanyo-biomedical.de">www.sanyo-biomedical.de</a>	2.1.2	Histologische Bearbeitung
CASY:	Innovatis AG Meisenstr. 96 D-33607 Bielefeld <a href="http://www.casy-technology.com">www.casy-technology.com</a>	Diamant Säge:	EXAKT Robert-Koch-Str. 5 D-22851 Norderstedt <a href="http://www.exakt.de">www.exakt.de</a>
Cyto-FACS :	Becton Dickinson GmbH Tullastr. 8-12 D-69126 Heidelberg <a href="http://www.bdeurope.com">www.bdeurope.com</a>		

## 2.2 Reagenzien und Lösungen

### 2.2.1 Zellkultur

Beriplast P:	Novartis Behring Emil-von-Behring-Str. 76 D-35041 Marburg <a href="http://www.novartis-behring.de">www.novartis-behring.de</a>
FKS:	Biochrom AG Leonorenstr. 2-6 D-12247 Berlin <a href="http://www.biochrom.de">www.biochrom.de</a>
$\beta$ -mercaptoethanol:	SERVA Electrophoresis GmbH Carl-Benz-Str. 7 D-69115 Heidelberg <a href="http://www.serva.de">www.serva.de</a>
Medium:	Gibco Invitrogen Technologie Park Karlsruhe Emmy Noether Str. 10 D-76131 Karlsruhe <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
PBS, Trypsin/ EDTA und Gentamycin:	PAN Biotech GmbH Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach <a href="http://www.pan-biotech.de">www.pan-biotech.de</a>
Lymphoprep:	Axis- Shield Po AS P.O. Box 6863 Rodeløkka N- 0504 Oslo, Norway <a href="http://www.axis-shield-poc.com">www.axis-shield-poc.com</a>

### 2.2.2 Histologische Bearbeitung

Technovit 9100 neu:	Heraeus Kulzer GmbH Grüner Weg 11 D-63450 Hanau <a href="http://www.heraeus-dental.de">www.heraeus-dental.de</a>
------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 2.2.3 Fluoreszenzfärbung

Osteokalzin:	BIOTREND Chemikalien GmbH Im Technologiezentrum Koeln Eupener Str. 157 D-50933 Köln <a href="http://www.biotrend.com">www.biotrend.com</a>
VEGF:	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Bergheimer Str. 89-2 D-69115 Heidelberg <a href="http://www.scbt.com">www.scbt.com</a>
Fitc:	KPL, Inc. 910 Clopper Road Gaithersburg, MD, USA 20878 <a href="http://www.kpl.com">www.kpl.com</a>
Cy3:	Jackson ImmunoResearch Lab., Inc. P.O. Box 9 872 West Baltimore Pike West Grove, PA, USA 19390 <a href="http://www.jacksonimmuno.com">www.jacksonimmuno.com</a>
DAPI:	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe Emmy-Noether Strasse 10 D-76131 Karlsruhe <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
Prolong Gold:	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe Emmy-Noether Strasse 10 D-76131 Karlsruhe <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>

---

## 2.3 Sterilbedingungen

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, Oberflächen wurden stets desinfiziert, Handschuhe wurden getragen und mehrfach verwendete Materialien wurden im Autoklaven (10 Minuten, 121°C, 1 bar) sterilisiert. Reagenzien und Medien wurden bei 4°C gelagert.

## 2.4 Zellkultivierung

### 2.4.1 Zellgewinnung der Stromazellen

Stromazellen wurden aus Knochenmarksaspiraten des Beckenkammes eines adulten gesunden Spenders gewonnen. Dies erfolgte im Rahmen von Knochenentnahmen bei einer Knochentransplantation in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie im Zentrum Zahn, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen. Der Spender wurde vor der Entnahme über Studienziele sowohl mündlich, als auch schriftlich informiert. Die Verwendung erfolgte ausschließlich mit schriftlicher Einwilligung des Spenders (UKG Ethikantrag-Nr.:Az. 15/10/01)

Die Zellisolation und Zellkultivierung erfolgte wie bereits durch Zhu et al. beschrieben (Zhu et al. 2010)

### 2.4.2 Zellisolierung Mononukleärer Zellen

Die Isolierung der Mononukleären Zellen von der gewonnenen Probe erfolgte mittels Lymphoprep (Axis- Shield Poc AS, Oslo, Norwegen) durch Dichte-Gradient-Zentrifugation. Dabei wurde eine Schicht Blut über eine Schicht Lymphoprep gegeben. Durch Zentrifugation konnten Erythrozyten das dichtere Lymphoprep durchdringen und Lymphozyten und mononukleäre Zellen blieben zurück (Abb. 5).

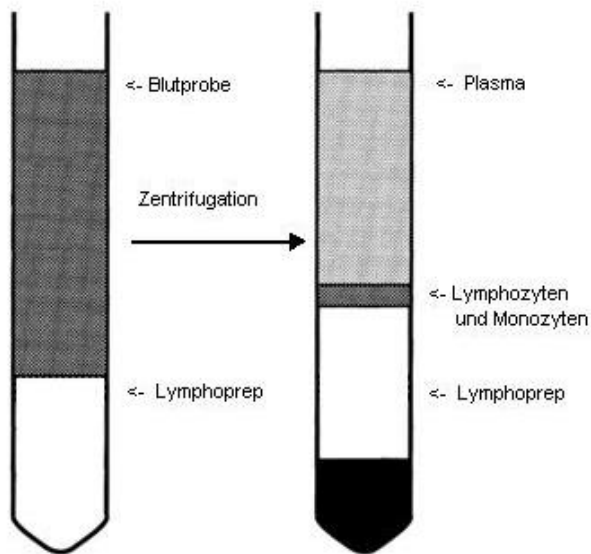


Abb. 5: Schematische Darstellung der Zellisolierung durch Lymphoprep

Diese wurden abpipetiert und mit PBS (Gibco, Invitrogen) gewaschen und resuspendiert bei  $2 \times 10^6$  Mononukleäre Zellen/  $\text{cm}^2$  in MSC Medium.

Das MSC Medium setzte sich wie folgt zusammen: 4,5 g Glukose DMEM (Gibco), 15% FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1% ( $5 \times 10^5$ )  $\beta$ - Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME, Serva, Heidelberg, Deutschland) und 1% nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, Gibco), 2% Gentamycin (PAN biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland), wie beschrieben durch Guan et al. (Guan et al. 1999). Die Zellkultur wurde bei  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

#### 2.4.3 Passagieren der humanen Knochenmarkstromazellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte ab einer Besiedlungsdichte von ca. 80%. Nach vorsichtigem Absaugen des Nährmediums wurde die Kultur mit 15 ml PBS-Puffer unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend wurde der PBS-Puffer wieder abgesaugt, 1-2 ml 0,05% Trypsin 5-mM EDTA (Biochrom AG, Deutschland) dazugegeben und für 5-10 min in den Brutschrank überführt, um die Zelladhäsion zu lösen. Danach wurde mit 8 ml FKS- Medium gespült. Aus dem 10 ml Gemisch (Zellen + Trypsin + FKS- Medium) wurden 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension für die Zellzählung mit CASY entnommen. Die Zentrifugation erfolgte bei 300 G für 5 min. Durch Absaugen der flüssigen Phase konnte ein Zell-Pellet gewonnen werden.

Die Aussaat der Zellen erfolgte mit 20 ml Medium, um ca. 500.000 Zellen pro Kulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) zu expandieren.

## 2.4.4 Zellsortierung mit Cyto- FACS

### 2.4.4.1 Grundlagen

Vor Versuchsbeginn wurde ein Teil der Zellen je nach Oberflächeneigenschaften mit Cyto-FACS (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) sortiert. FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) ist ein Verfahren zur Analyse und Auftrennung von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften (Abb. 6). Das Prinzip ist von Herzenberg et al. ausführlich beschrieben worden (Herzenberg et al. 2002).

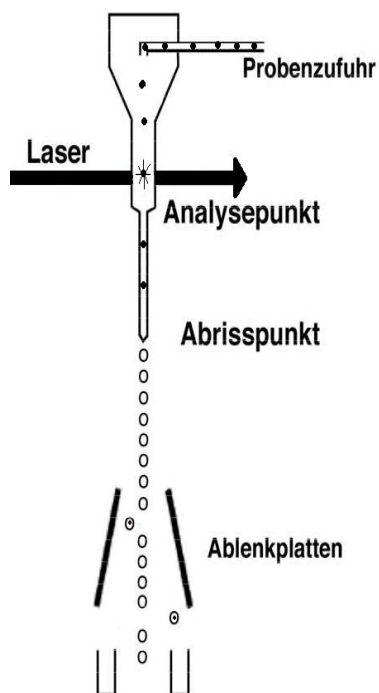


Abb. 6: Schematische Darstellung der Zellsortierung durch Cyto-FACS

Grundlage der FACS-Analyse ist eine Einzelzellsuspension, die als dünner Flüssigkeitsstrahl auf einen fokussierten Laserstrahl trifft (Analysepunkt). Das hierbei entstandene Lichtsignal wird gemessen, in elektronische Signale umgewandelt und als Messdaten gespeichert. Während der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt, und gelangen einzeln in die Durchflusskammer.

Nach quantitativer Auswertung der Daten können die Bestandteile auf verschiedene Röhren je nach Eigenschaften verteilt werden. Gemessen werden Lichtstreuung und Fluoreszenz, um die Zellen je nach Zellgröße, Struktur der Zellmembran, intrazelluläre Bestandteile und Absorptionsspektrum aufzuteilen.

## 2.4.4.2 Stromazellen gesamt

Die Abb.7 zeigt die insgesamt registrierten Stromazellen der FACS-Analyse. Um eine spezielle Gruppe der Zellen zu erfassen, wurde durch die Region R1 ein *Gate* festgelegt. Die Analyse berücksichtigt auf der X-Achse das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter = FSC*), das dem Volumen der Zelle proportional ist und auf der Y-Achse das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter = SSC*), das als Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel proportional zur Granulierung der Zelle und der Größe und Struktur des Zellkerns ist.

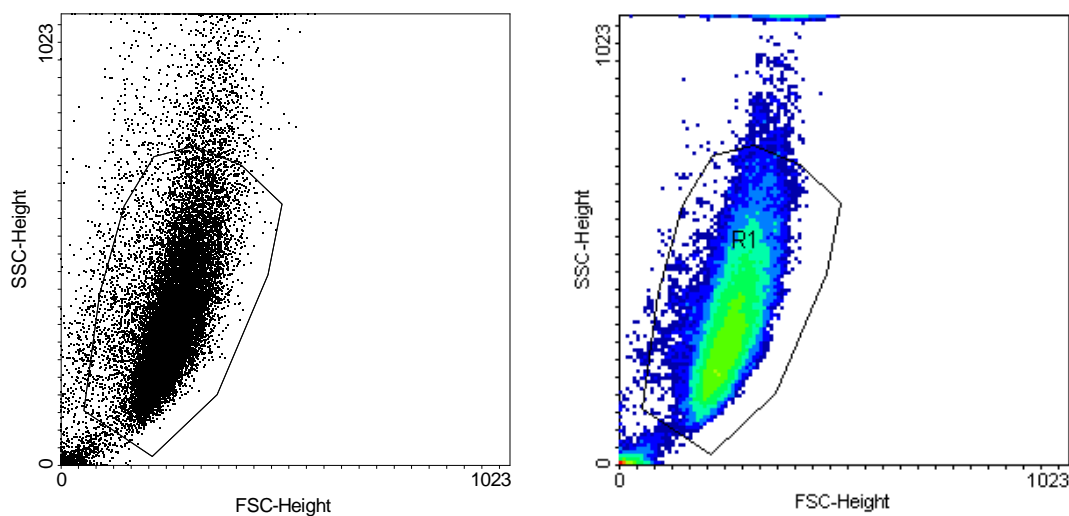


Abb. 7: Stromazellen gesamt, Definition des *Gates*

Durch Anwendung des *Gates* werden außerhalb befindliche Zellen nicht erfasst und artifizielle Messungen verringert. 86,75% der Zellen befinden sich innerhalb des *Gates* (Tab.1)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
R0	239.4	337.1	24124	100.00	100.00
R1	252.3	327.5	20928	86.75	86.00

Tab.1: Registrierung der Stromazellen vor (R0) und nach Festlegung des *Gates* (R1)



### 2.4.4.3 FITC-Kontrolle

Die weitere Auswertung der Oberflächenmarker wurde Immunhistochemisch mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) durchgeführt.

Für die Festlegung der Quadranten als Grenze zur Anerkennung einer Registrierung und zur weiteren Minimierung artifizierlicher Messungen, wurde eine Kontrolle der FACS-Analyse erhoben.

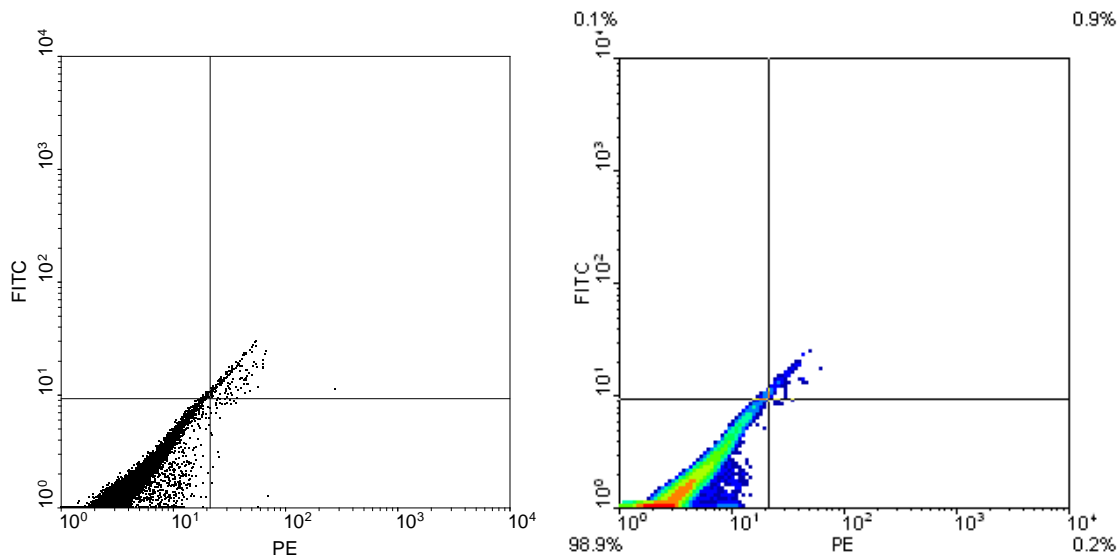


Abb. 8: FITC-Kontrolle der FACS-Analyse

Mit Hilfe dieser Negativ-Kontrolle können Oberflächenmarker eindeutiger abgegrenzt werden. Eine Expression von Oberflächenmarkern erwartet man als deutliche Registrierung besonders in den Quadranten UL, UR und LR (Tab.2).

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	19.80	9.9	24.00	0.12	0.14
2 UR	33.40	14.0	160	0.80	0.94
3 LL	3.5	1.4	16859	84.30	98.76
4 LR	28.20	5.7	28.00	0.14	0.16

Tab. 2: FITC-Kontrolle zur Festlegung der Quadranten, UL=*upper left*, UR=*upper right*, LL=*lower left*, LR=*lower right*

## 2.4.4.4 CD 73 (positive Expression)

Der Oberflächenmarker CD 73 zeigte eine deutlich vermehrte FITC-Registrierung (Abb.9).

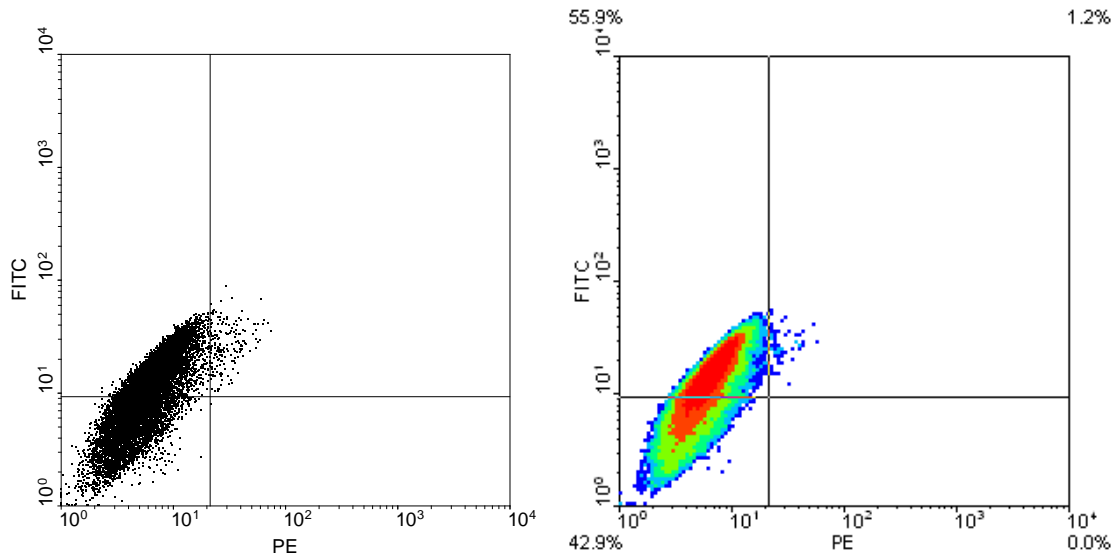


Abb. 9: FACS-Analyse CD 73

Im Quadranten UL wurden für diesen Fall 59,64% der Ereignisse verzeichnet, somit ist dieser Oberflächenmarker auf den gemessenen Zellen exprimiert (Tab.3).

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	7.5	16.2	8624	49.28	59.64
2 UR	30.1	26.7	188	1.07	1.30
3 LL	4.1	5.0	5646	32.26	39.05
4 LR	21.7	7.9	1	0.01	0.01

Tab. 3: FACS-Analyse CD73

2.4.4.5 CD 105 (positive Expression)

Der Oberflächenmarker CD 105 zeigte eine deutlich vermehrte PE-Registrierung (Abb.10)

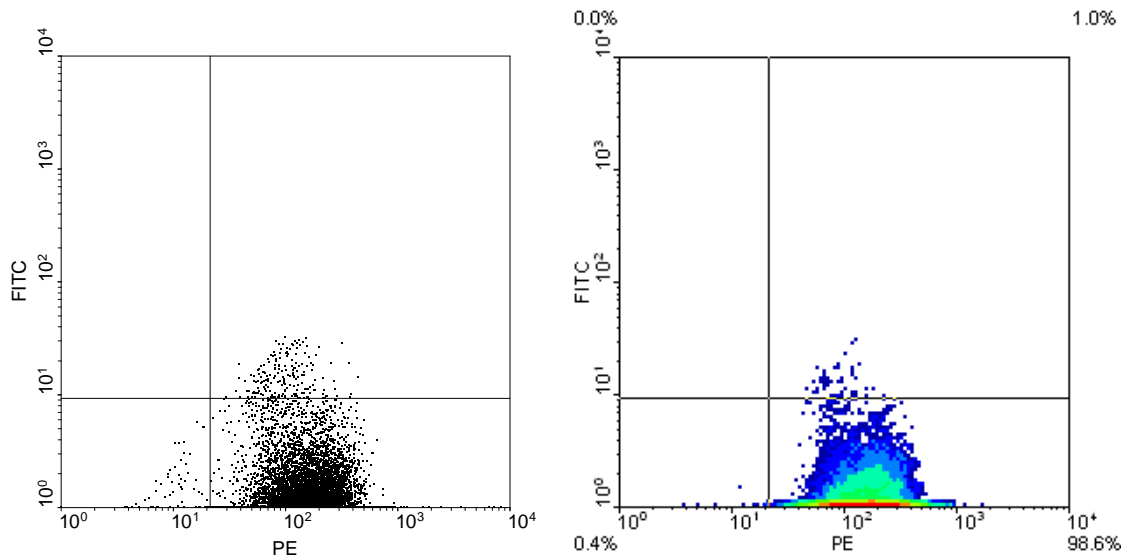


Abb10: FACS-Analyse CD 105

Im Quadranten LR wurden für CD 105 98,42% der Ereignisse verzeichnet, was für eine Expression dieses Oberflächenmarkers auf den Zellen spricht (Tab.4).

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00
2 UR	100.5	14.4	194	0.97	1.18
3 LL	11.1	1.4	66	0.33	0.40
4 LR	154.3	1.2	16159	80.80	98.42

Tab. 4: FACS-Analyse CD 105

## 2.4.4.6 CD 90 (positive Expression)

Auch der Oberflächenmarker CD 90 zeigte vermehrte PE-Registrierungen (Abb.11)

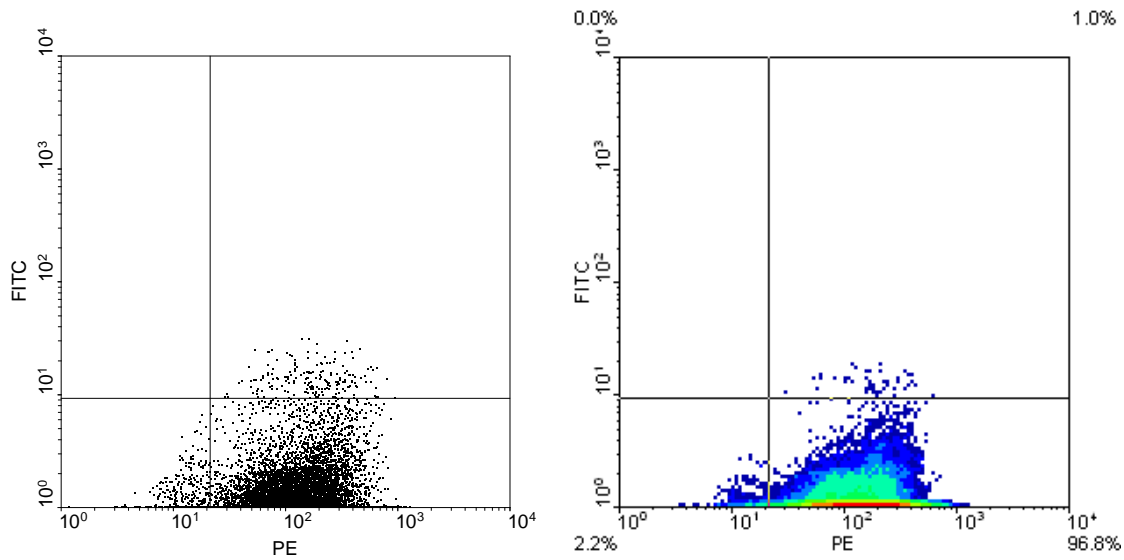


Abb. 11: FACS-Analyse CD 90

Im Quadranten LR wurden 96,80% der Ereignisse ermittelt, somit war auch dieser Oberflächenmarker positiv (Tab. 5)

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2 UR	172.2	13.7	192	0.96	1.13
3 LL	12.9	1.3	353	1.77	2.07
4 LR	144.4	1.2	16481	82.41	96.80

Tab. 5: FACS-Analyse CD 90

## 2.4.4.7 CD 45 (fehlende Expression)

Der Oberflächenmarker CD 45 ergab weder für FITC, noch für PE einen positiven Ausschlag (Abb.12). Seine Analyse zeigte ein ähnliches Bild, wie die Kontrolle.

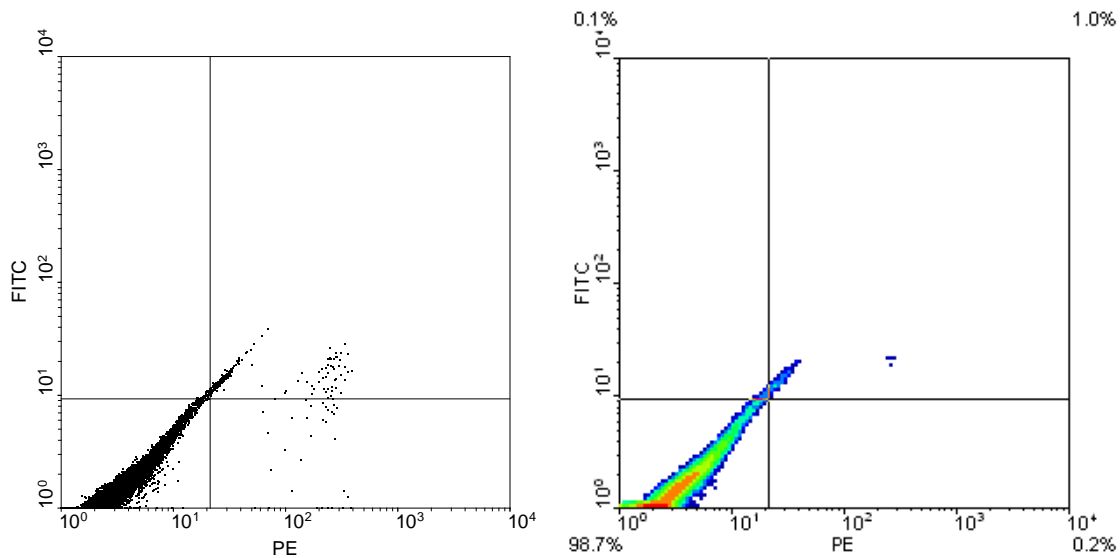


Abb. 12: FACS-Analyse CD 45

Die Tabelle verdeutlicht, dass 98,57% der Ereignisse für FITC und PE keinen Ausschlag gezeigt haben (Tab.6). Der Oberflächenmarker CD 45 wurde folglich nicht exprimiert.

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	19.7	10	32	0.16	0.18
2 UR	50.1	14.2	184	0.92	1.05
3 LL	3.4	1.5	17196	85.98	98.57
4 LR	176.3	3.4	33	0.17	0.19

Tab. 6: FACS-Analyse CD 45

---

#### 2.4.4.8 Bewertung der FACS-Analyse

Zusammenfassend zeigte die FACS-Analyse eine positive Expression der Oberflächenmarker CD 73, CD 90, CD 105. Der Oberflächenmarker CD 45 zeigte keine Expression. Dieses Muster und die in der Zellkultur gezeigte Adhäsionsfähigkeit der Zellen auf Kunststoffoberflächen spricht nach den Kriterien der *International Society For Cellular Therapie* (Dominici et al. 2006) für die Charakterisierung der Knochenmarkstromazellen als humane mesenchymale Stammzellen.

#### 2.4.5 Zellzählung mit CASY

Die Zellzählungen zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit dem CASY-Zellzählgerät (Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland) durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet nach dem Widerstandsprinzip und ist besonders dafür geeignet, auch geringe Zellkonzentrationen bis 10.000 c/ml genau zu bestimmen.

Zur Messung werden die Zellen in isotoner Elektrolytlösung suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messkapillare mit definiertem Durchschnitt gesaugt, an die über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt ist. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängt die Zelle eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Es kommt zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Diese Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen, wobei die jeweilige Pulsfläche dem Zellvolumen proportional ist und die Anzahl der Impulse der Anzahl der Zellen in der Probe entspricht.

Aus den Einzelmessungen, die durch Zellen hervorgerufen werden, die beim Durchtritt durch die Meßpore ein Signal mit entsprechender Pulsfläche erzeugen, berechnet CASY das Integral des Meßsignals (Pulsflächenanalyse). Aus der volumenlinearen Originalverteilung wird eine durchmesserlineare Größenverteilung berechnet.

## 2.5 Biomaterial und Besiedelung

### 2.5.1 Trägermaterial

Als Trägermaterial wurde Biocoral (Biocoral, Inc., La Garenne Colombes, Frankreich) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein natürliches Material, gewonnen aus dem deproteinisierten Kalziumkarbonat- Skelett einer Südseekoralle. Nach Trocknung und Sterilisation bleibt das Gewebe in seiner ursprünglichen Form und schafft mit seinen biomechanischen Eigenschaften günstige Voraussetzung, um den Ansprüchen des menschlichen Knochens gerecht zu werden.

Chemisch besteht Biocoral zu 98% aus Kalziumkarbonat in kristalliner Form des Aragonits und aus Spurenelementen wie Phosphor in Form von Phosphat, sowie Natrium, Magnesium, Strontium und Kalium, die eine ähnliche Verteilung zeigen wie der menschliche Knochen. Die Porosität beträgt 75% bei einer Porengröße von 200- 300 µm und hoher Interkonnektion. Die zylinderförmigen Träger hatten einen Durchmesser von 5 mm und eine Dicke von 3 mm.

### 2.5.2 Besiedelung der Träger mit humanen Knochenmarkstromazellen

Für die Besiedelung der Trägermaterialien wurden Zellen der zweiten Passage verwendet. Nachdem die Zellen mit dem CASY- Zellzählgerät ausgezählt und die Träger mit Medium bei 5% CO<sub>2</sub> / 37°C über Nacht befeuchtet wurden, erfolgte die Besiedelung nach dem „*droplet seeding*“ Verfahren auf zwei verschiedene Weisen:

Besiedelung der Trägermaterialien ohne Fibrin-Matrix:

Die Träger wurden in 24- Well-Platten abgelegt. Die Zellen wurden resuspendiert in Medium und 30 µl der Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $5,4 \times 10^6$  Zellen/ml auf jeden Träger gegeben. Das ergab eine Besiedelung mit 162000 Zellen pro Träger. Die Zell- Biomaterial-Konstrukte wurden in einen Inkubator überführt und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> für 3 h inkubiert.

Besiedelung der Trägermaterialien mit Fibrin-Matrix:

Die Träger wurden in 24- Well- Platten abgelegt. Die Zellen wurden resuspendiert in Medium und mit Fibrinogen-Lösung (Beriplast P, ZLB Behring GmbH, Marburg, Deutschland) im Verhältnis 3:1 v/v vermischt, was auch einer Zelldichte von  $5,4 \times 10^6$  Zellen/ ml entsprach. Die Besiedelung erfolgte, indem 30 µl der Zell-Fibrinogen-Lösung auf jeden Träger gegeben wurde, was ebenfalls 162000 Zellen pro Träger ergab. Anschließend wurden 8 µl Thrombin-Lösung (Beriplast P, ZLB Behring GmbH, Marburg, Deutschland) im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und auf jeden Träger gegeben, um das Fibrin zu polymerisieren und ein lockeres

dreidimensionales Netzwerk im Träger zu erzeugen. Die Zell- Biomaterial- Konstrukte wurden in einen Inkubator überführt und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Träger auf neue 24- Well- Platten überführt und vorsichtig mit 1 ml Kulturmedium bedeckt.

Alle Zell- Biomaterial- Konstrukte wurden bei 37°C und 5% Luftfeuchtigkeit inkubiert und durch kompletten Mediumaustausch alle 3 Tage mit Nährstoffen versorgt. Zu den Zeitpunkten 2. Tag, 1. Woche, 2. Woche und 3. Woche wurden jeweils vier Träger der entsprechenden Gruppe entnommen und der weiteren histologischen Bearbeitung zugeführt.

## 2.6 Histologische Bearbeitung

### 2.6.1 Einbettung

Die entnommenen Trägermaterialien wurden mit PBS ausgewaschen, für 24 h in 4% Formalin fixiert und anschließend nach folgendem Protokoll mit Technovit 9100 „New Solutions“ (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet:

- aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) zur Dehydratation
- Xylol für 2 h zur Säuberung
- MM- Destabilisierungslösung für 12 h bei 4°C
- Praeinfiltrationslösung für 24 h bei 4°C
- Infiltrationslösung für 36 h bei 4°C
- Polymerisationslösung A:B = 9:1
- Polymerisation für 2 d bei 2°C.

### 2.6.2 Anfertigung der Trägerschnitte

Nach der Einbettung folgte die Anfertigung longitudinaler Schnitte in sagittaler Ebene parallel zur Achse des Zylinders (Abb.13). Hierfür wurde eine diamantbeschichtete Säge (Fa. Exakt, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Es wurden je Träger sechs Schnitte mit einer Schnittbreite von 500µm angefertigt, wobei übrige Randbereiche wegen mangelnder Möglichkeiten der Auswertung verworfen wurden.



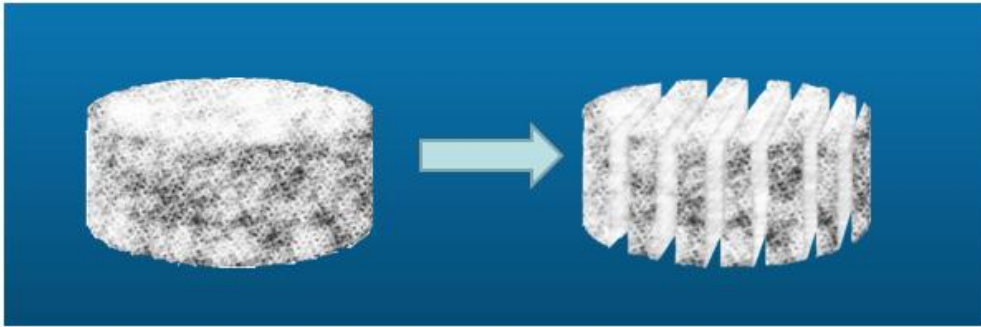


Abb. 13: Anfertigung der longitudinalen Trägerschnitte in sagittaler Ebene

### 2.6.3 Entplastung der Trägerschnitte

Die fertigen Schnitte wurden über Nacht in MEA (2-Methoxyethylazetat, Merck, Deutschland) belassen. Danach folgte die Beimpfung mit Xylol für 2 x 5 min, eine absteigende Alkoholreihe für je 5 min mit 100%, 96%, 70% und 40% Ethanol und eine Waschung mit destilliertem Wasser für 5 min.

## 2.7 Fluoreszenzfärbungen

Zuerst erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd für 10 min, danach eine Waschung für 3 x 5 min mit PBS. Anschließend wurden die Zellmembranen mit Triton X für 10 min permeabilisiert und erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Zum Blocken wurde für 10 min eine BSA/ PBS- Lösung verwendet.

Zunächst erfolgte die Anlagerung der Primärantikörper für Osteokalzin und VEGF für 1 h. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper Fitc und Cy3 auf die Schnitte gebracht. Es folgte erneut das Waschen für 3 x 5 min mit PBS und die Kernfärbung mit DAPI für 15 min. Nach einer letzten Waschung für 2 x 5 min mit PBS erfolgte die Eindeckung der Schnitte in Prolong Gold (Invitrogen, Deutschland), um eine Austrocknung des Materials unter dem Fluoreszenzmikroskop zu vermeiden.

## 2.8 Mikroskopische Untersuchung

Für die Auswertungen der fluoreszenzgefärbten Schnitte wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit einem ApoTome<sup>®</sup>- Schieber (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Deutschland) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, das den Ansprüchen, die dicke Schnitte in Bezug auf Kontrast und Auflösung fordern, gerecht wird. So kann es gerade bei dickeren Schnitten zu

Überlagerungsphänomenen von ober- bzw. unterhalb der Fokusebene liegenden Bildpunkten kommen, was als Überstrahlung bezeichnet wird. Das ApoTome<sup>®</sup>- System versucht dieses Phänomen zu verringern, indem ein optischer Schnitt über die Bildebene gelegt wird.

Dafür wird der ApoTome<sup>®</sup>-Schieber mit seiner Gitterstruktur definierter Breite in die Ebene der Leuchtfeldblende eingebracht, und in die Fokusebene des Objektes projiziert. Es werden jeweils 3 Rohbilder erstellt, welche verrechnet werden, wobei nur diejenigen Bildpunkte berücksichtigt werden, die in dieser Fokusebene liegen. Darüber- und darunterliegende Schichten („*Out-of-Fokus*“- Bildanteile) und die Gitterstruktur werden entfernt.

Darüber hinaus ist es möglich mit dieser Methode die Schichten der Schnitte eines Trägers einzeln in genau definierten Abständen in z- Ebene abzufahren und anschließend dreidimensional zu rekonstruieren. Es entsteht ein z- Stapel von Fokusschnitten (optische Schnitte) durch das Objekt mit definierter Fokusschnittdicke und definiertem Fokusschnittabstand.

Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop mit 10 facher Vergrößerung analysiert.

Die Lichtquelle hatte für die Kernfärbung DAPI (blau) eine Wellenlänge von 365 nm, für die Osteokalzinfärbung Cy3 (grün) 550 nm und für die VEGF- Färbung FITC (rot) 490 nm.

Die Schnitte der Trägermaterialien wurden nach einem festgelegten Raster je nach Position und davon abhängiger Breite des Schnittes analysiert (Zhu et al. 2010). Der je Abschnitt registrierte Bereich hatte die Abmessungen 866  $\mu\text{m}$  X 648  $\mu\text{m}$ . Es ergaben sich 5 Abschnitte von der Oberfläche bis zum Boden (0  $\mu\text{m}$  bis 648  $\mu\text{m}$  ; 648  $\mu\text{m}$  bis 1296  $\mu\text{m}$ ; 1296  $\mu\text{m}$  bis 1944  $\mu\text{m}$ ; 1944  $\mu\text{m}$  bis 2592  $\mu\text{m}$ ; 2592  $\mu\text{m}$  bis 3000  $\mu\text{m}$ ) und 5 Spalten (Zentrum -433  $\mu\text{m}$  bis 433  $\mu\text{m}$ ; je 2 intermediäre Regionen (-433  $\mu\text{m}$  bis -1499  $\mu\text{m}$ / 433  $\mu\text{m}$  bis 1499  $\mu\text{m}$ ) und je 2 periphere Regionen (-1499  $\mu\text{m}$  bis- 2500  $\mu\text{m}$ / 1499  $\mu\text{m}$  bis 2500  $\mu\text{m}$ ) (Abb.14).

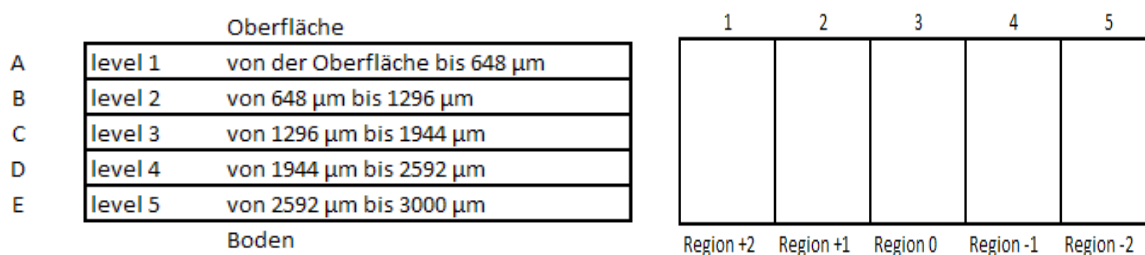


Abb14: Rastereinteilung der Schnitte in Sektionen (modifiziert nach Zhu et al. 2010)

Die Axiovision Software ermöglichte es, den betreffenden Bereich in mehrdimensionaler Bildaufnahme und maximaler Rauschunterdrückung für jeden der drei Fluoreszenzfarben (Zellkerne (blau), Osteokalzin grün) und VEGF (rot)) in z- Stapeln zu erfassen. Dabei wurden jeweils 20 Aufnahmen in Z- ebene erstellt mit einem konstanten Stapelabstand von 6  $\mu\text{m}$ .

## 2.9 Quantitative Erfassung der Fluoreszenzmaxima

Die Registrierung der Zellzahl und der Zellverteilung erfolgte durch AxioVision Image Analysis Software (Carl Zeiss, Deutschland). Dabei wurden zunächst alle Fluoreszenzmaxima des Zellkernfarbstoffes DAPI oberhalb einer definierten Grenze für Größe und Farbintensität registriert. Überall dort, wo ein Zellkern ermittelt wurde, wurden in definiertem Abstand um den Zellkern und ebenfalls oberhalb einer definierten Fluoreszenz-Intensitäts-Grenze die Maxima der Differenzierungsmarker für Osteokalzin und VEGF registriert und tabellarisch aufgelistet.

## 2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Statistika. Für den Vergleich der Besiedlungstechniken unter Berücksichtigung der insgesamt registrierten Zellzahlen, der quantitativ registrierten Differenzierungen für Osteokalzin bzw. VEGF und der prozentual registrierten Differenzierungen für Osteokalzin bzw. VEGF wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Für den Vergleich der jeweils unabhängigen Stichproben erfolgte die Berechnung der Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Zur Ermittlung der longitudinalen Veränderung der Mittelwerte im Intervall wurde jeweils für die Gruppe mit Fibrin und für die Gruppe ohne Fibrin der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Um die Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte zwischen den Gruppen mit und ohne Fibrin vergleichen zu können und für den Vergleich von zentralen Regionen mit peripheren Regionen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag für alle Tests bei  $p < 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Differenzierungsvorgängen im Trägermaterial

##### 3.1.1 Verbesserte Darstellung durch das Apotome<sup>®</sup>-Modul

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Erfassung von zellulären Strukturen im dreidimensionalen Trägermaterial wurde mittels Anwendung des ApoTome<sup>®</sup>-Moduls eine deutliche Verbesserung der Bilddarstellung erreicht. Durch Auslöschung von Fokusbereichen, die oberhalb und unterhalb der Fokusebene lagen, konnten artifizielle Oberflächenfluoreszenzen des Trägermaterials vermindert und definierte Schichten im Träger erfasst werden (Abb. 15). Die so gewonnenen Schnittebenen und die Minimierung von Überlagerungsphänomenen ermöglichten die Darstellung und Auswertung des Trägermaterials in definierten Abschnitten und Schichten.

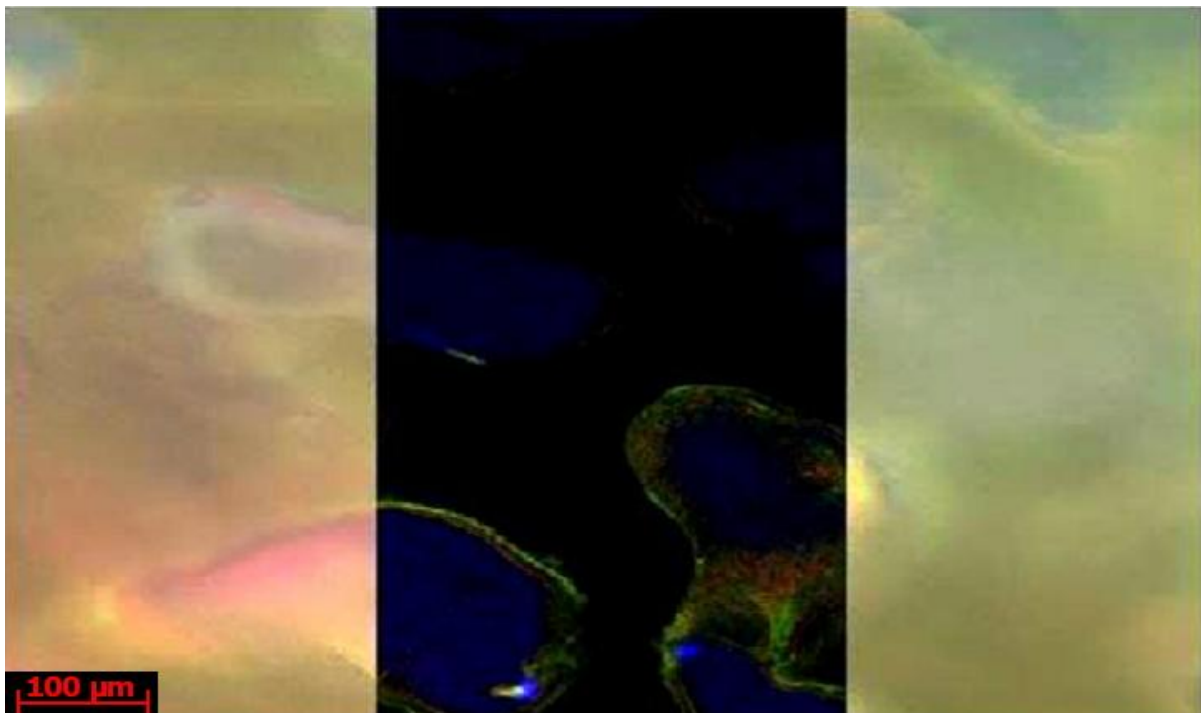


Abb.15: Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Biocoral-Trägermaterials mit und ohne ApoTome<sup>®</sup>-Modul

### 3.1.2 Erfassung von Differenzierungsvorgängen

Bekannt ist, dass es mittels immunhistochemischen Verfahren grundsätzlich möglich ist, nicht nur Zellkerne, sondern auch Differenzierungsvorgänge fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen. Mit Hilfe des ApoTome<sup>®</sup>-Moduls konnten wir dieses Verhalten auch auf der Oberfläche der Biocoral-Trägermaterialien nachweisen. So ergaben sich in Regionen positiver Zellkernerfassung positive Fluoreszenzmaxima für die Differenzierungsmarker Osteokalzin und VEGF. Das zusammengefügte Mischbild enthält die Zellkernfärbung mit DAPI (blau) und die Färbungen für VEGF (rot) und Osteokalzin (grün) (Abb.16)

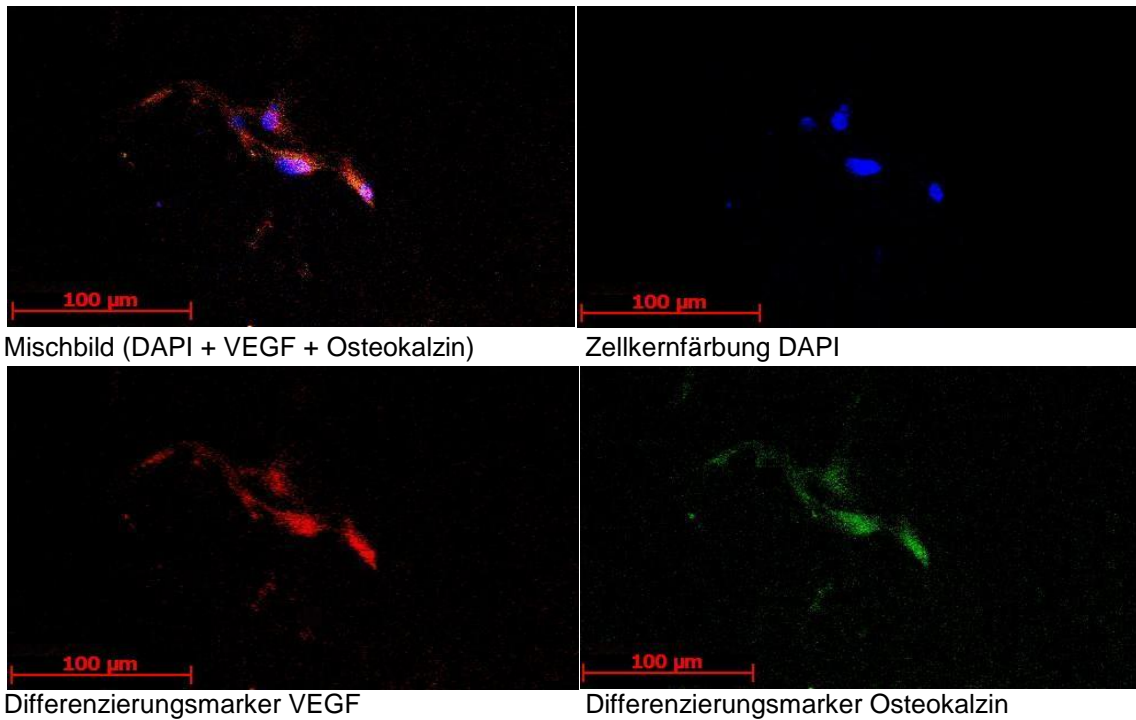


Abb. 16: Ausschnitt aus Detailaufnahme, Differenzierungsvorgänge im Biocoral-Trägermaterial

Mittels Anwendung von optischen Schnitten durch das dreidimensionale Konstrukt konnten somit die quantitative Verteilung, und die Differenzierung von Zellen im dreidimensionalen Trägermaterial nachgewiesen und sichtbar gemacht werden. Abb.17 zeigt einen solchen optischen Schnitt mit deutlich angefärbten Zellkernen auf der Oberfläche des Trägers.

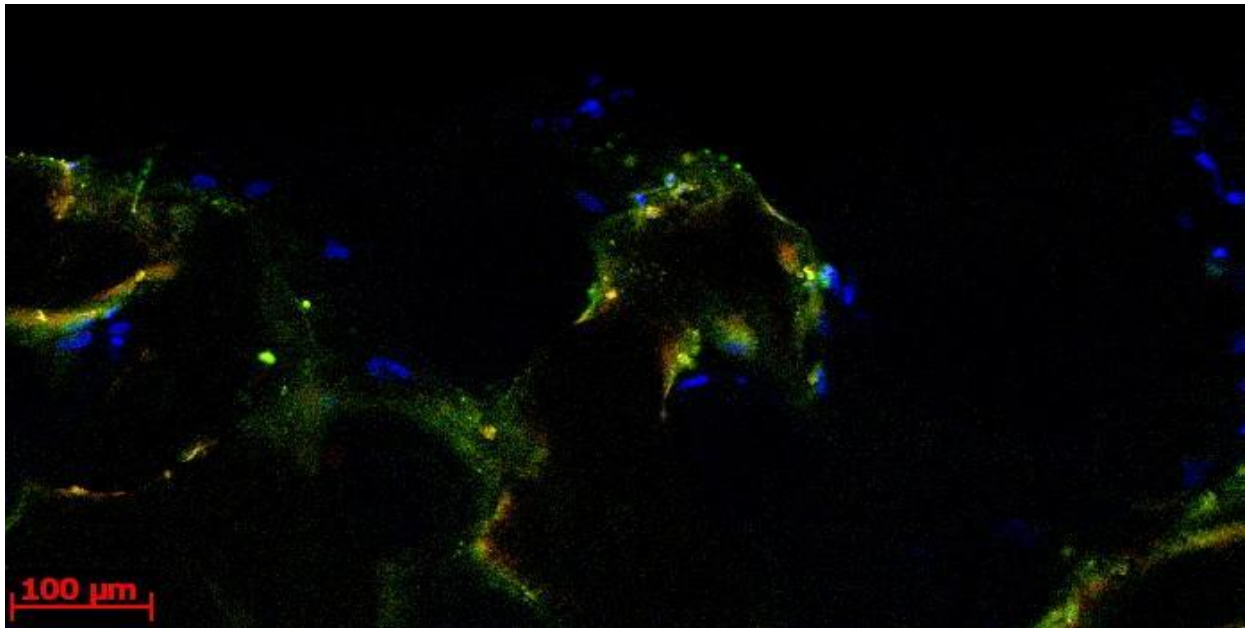


Abb. 17: Ausschnitt aus Übersichtsaufnahme, optischer Schnitt durch das Trägermaterial

Mit der gewählten Auflösung von 10 facher Vergrößerung und einem Stapelabstand von  $6\ \mu\text{m}$  zwischen den einzelnen Schichten war es in Einzelfällen sogar möglich, Zellausläufer zu erfassen und in ihrem Verlauf durch die Schichten zu verfolgen. Abb.18 zeigt Zellen, die Fortsätze zu benachbarten Strukturen ausbilden und für VEGF und Osteokalzin positiv sind.

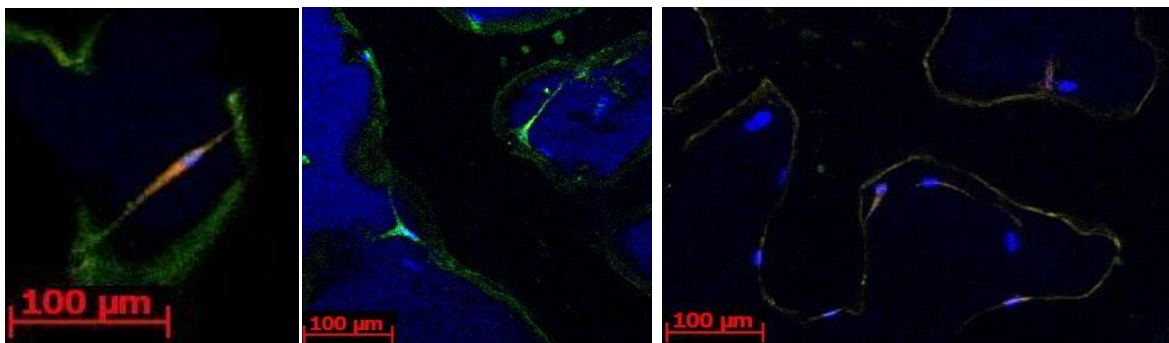


Abb. 18: Ausschnitte aus Übersichtsaufnahmen, Zellfortsätze in den Poren des Trägermaterials, Zeitpunkte: von links 1W, 2W, 3W, jeweils ohne Fibrinmatrix

Außerdem konnten wir in der Gruppe mit Fibrin-Matrix besonders bei Betrachtung der Randschnitte die Fibrinschicht nachvollziehen, die sich an der Oberfläche der Trägermaterialien abzeichnete (Abb.19). In dieser Fibrinschicht blieben nicht nur wie erwartet Zellen haften, sondern es zeigte sich darüber hinaus eine deutliche Anfärbung für die Differenzierungsmarker VEGF und Osteokalzin.

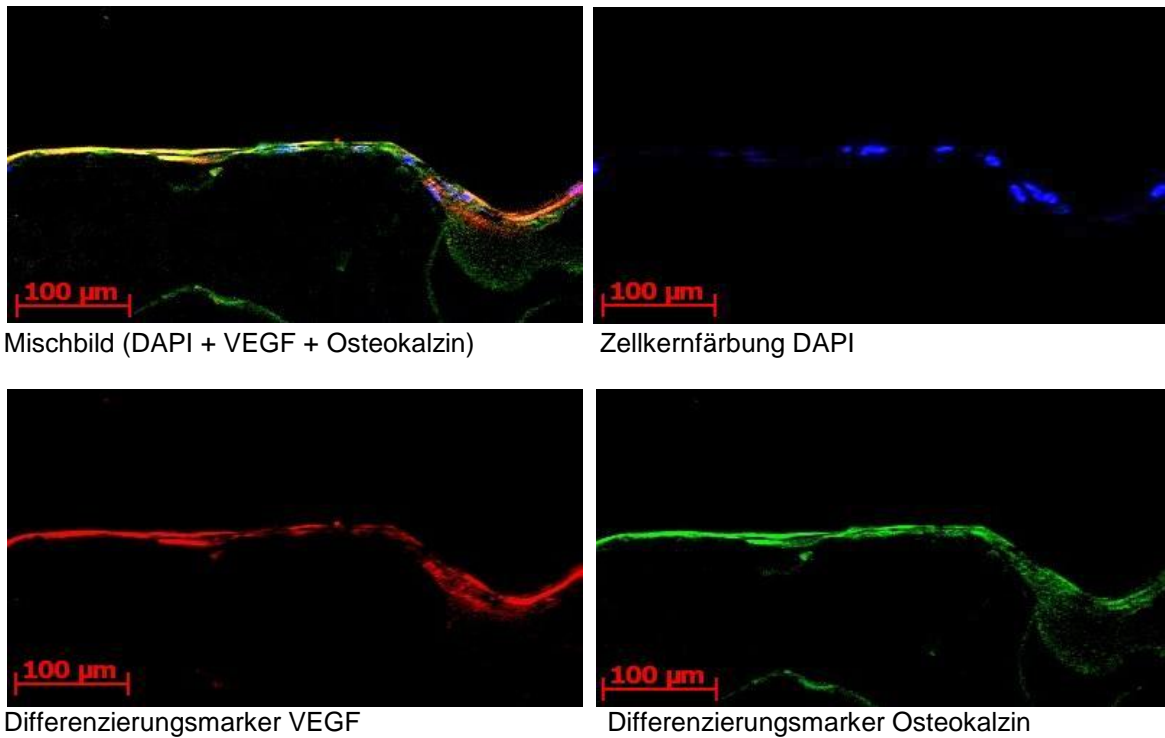
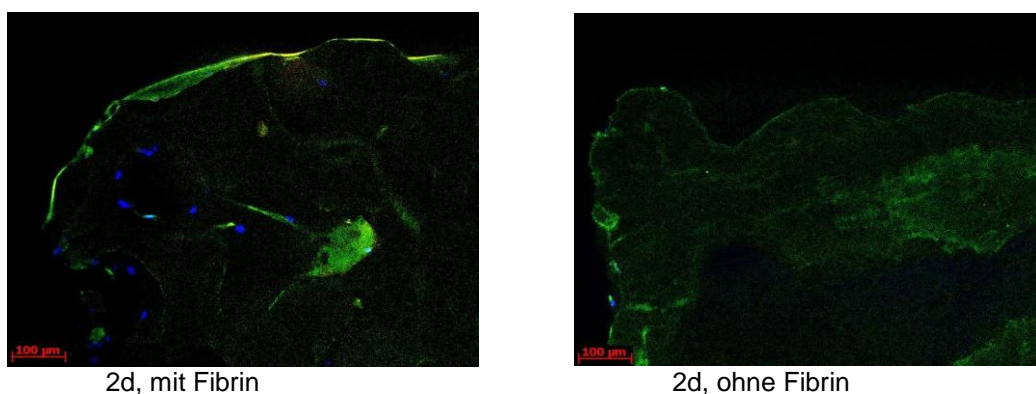


Abb19: Ausschnitt aus Übersichtsaufnahme, Auswertungsbereich A3, Fibrinschicht auf der Oberfläche des Trägermaterials

### 3.1.3 Darstellung der zellulären Differenzierung zu den verschiedenen Zeitpunkten

Bei der Betrachtung der zellulären Wachstums- und Differenzierungsvorgänge ergaben sich Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten. So stellten sich die Schnitte der Gruppe mit Fibrin-Matrix insgesamt zu allen Zeitpunkten zellreicher dar, als die Schnitte der Gruppe ohne Fibrin-Matrix. Außerdem zeigte sich in der Gruppe mit Fibrin im Verlauf eine zunehmende Ausfüllung der Porenstrukturen durch Osteokalzin-positives Material (Abb.20). Die Poren der Gruppe ohne Fibrin zeigten sich insgesamt weniger ausgefüllt.



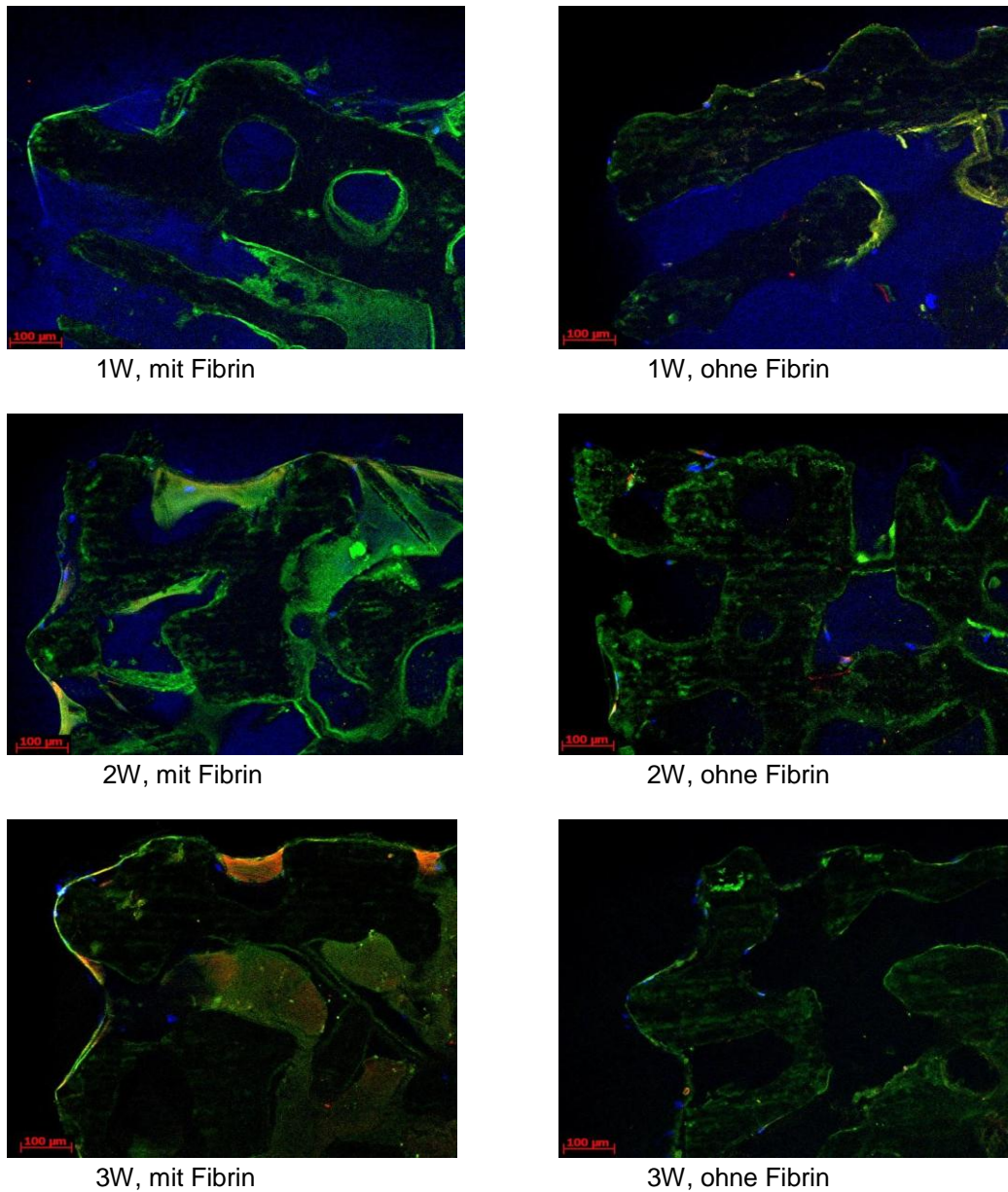


Abb.20: Beispielschnitte des Auswertungsbereiches A1 zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin-Matrix

## 3.2 Vergleich der Besiedlungstechniken

### 3.2.1 Zellkernmarker DAPI

Die Auswertung der gemessenen Zellkernerfassung zeigte ähnliche Ergebnisse, wie schon bereits durch Zhu et al. beschrieben (Zhu et al. 2010). Insgesamt verzeichneten wir eine signifikant höhere Anzahl an Zellen in der Gruppe der Trägermaterialien, die mit Fibrin-Matrix vorbehandelt wurde, als in der Gruppe ohne (Abb.21).



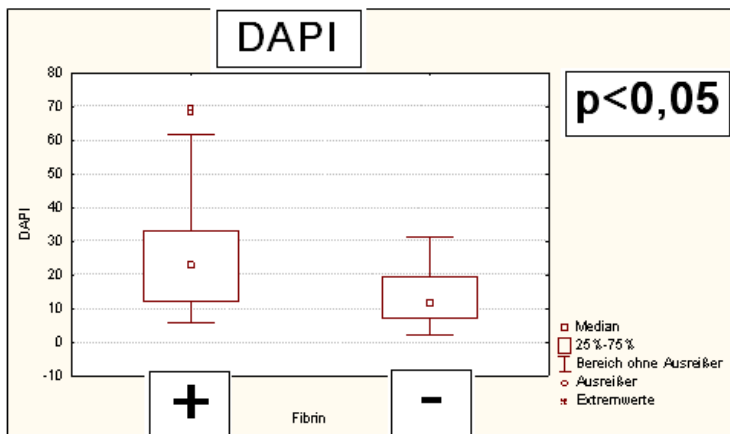
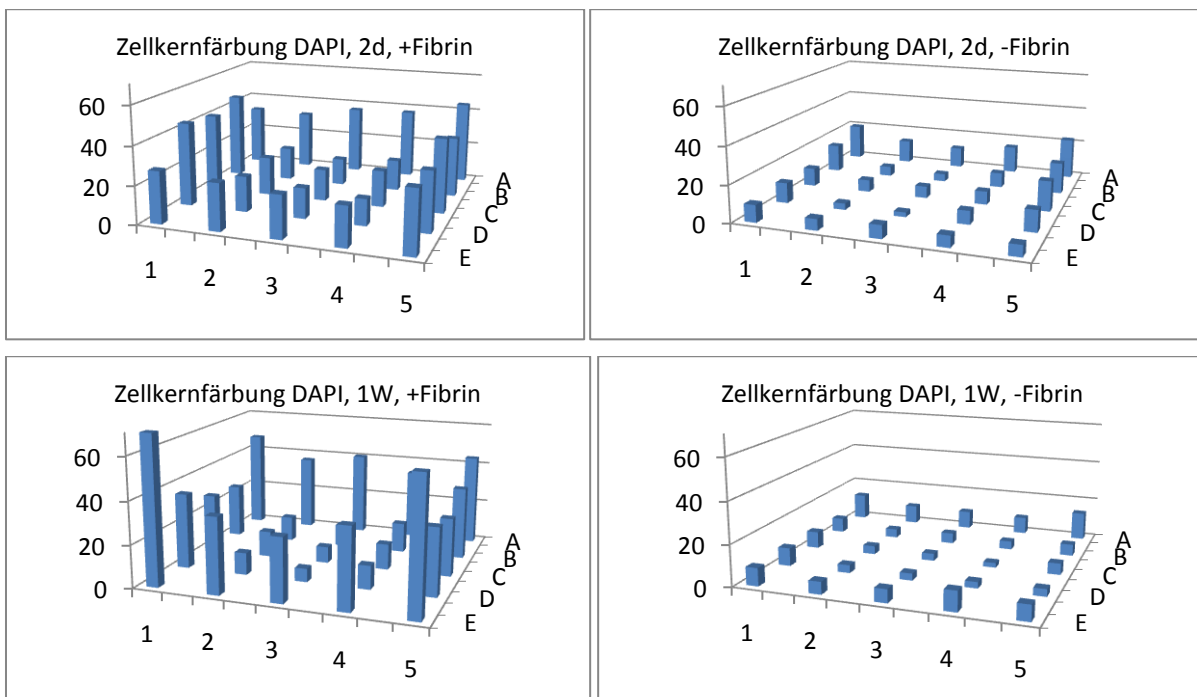


Abb.21: Vergleich der insgesamt registrierten Zellzahlen über alle Zeitpunkte, mit/ohne Fibrin

Dabei war die räumliche Verteilung in beiden Gruppen in der Peripherie deutlich höher als in zentrumsnahen Regionen. Zusätzlich zeigte sich in der Gruppe mit Fibrin-Matrix eine vermehrte Zellkernerfassung in bodennahen Regionen (E1-5) besonders zu späteren Zeitpunkten (Abb.22).



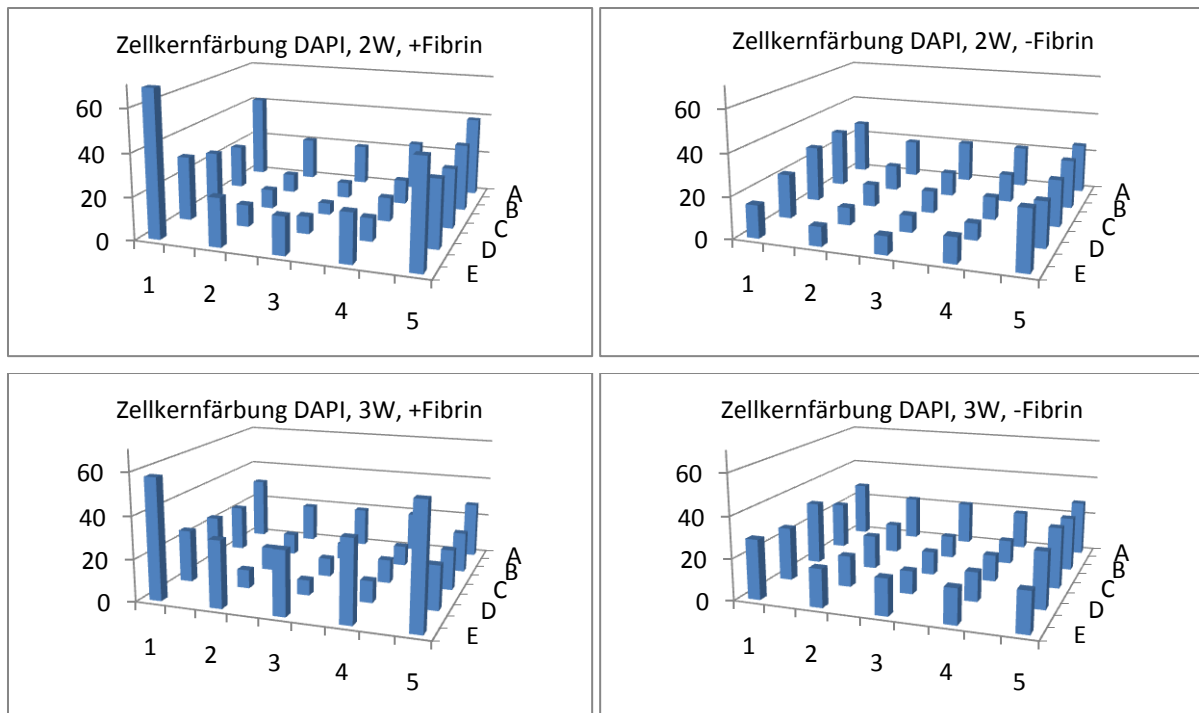


Abb.22: Quantitative Verteilung der Zellkernfärbung (DAPI); 2d, 1W, 2W, 3W; mit/ohne Fibrin

### 3.2.2 Differenzierungsmarker Osteokalzin

#### 3.2.2.1 Quantitative Analyse

Die quantitative Verteilung der Osteokalzin-positiven Fluoreszenzmaxima ergab eine signifikant vermehrte Registrierung in der Gruppe mit Fibrin, im Vergleich zu der Gruppe ohne Fibrin (Abb.24).

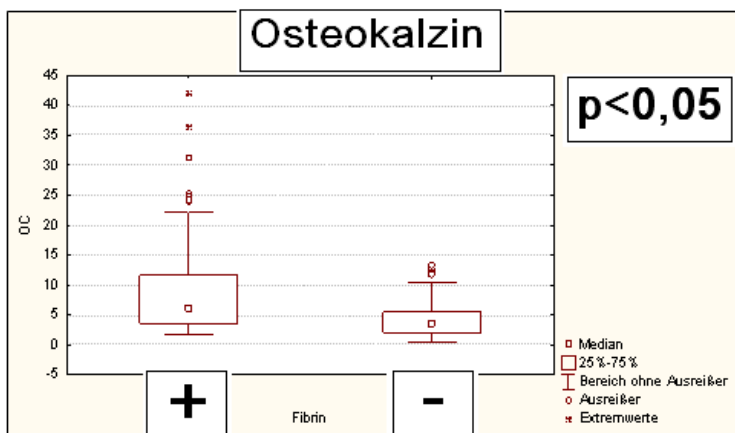


Abb.24: Vergleich der insgesamt registrierten Differenzierung für Osteokalzin, mit/ohne Fibrin

Darüber hinaus konnte bei dem registrierten Differenzierungsmarker Osteokalzin, ebenfalls eine Betonung der Peripherie verzeichnet werden. Besonders die bodennahen Regionen (E 1-5) zeigten dabei eine hohe Anzahl von Osteokalzin-positiven Bereichen (Abb.25). In Zentrumsnahe Regionen konnten nur geringfügige Differenzierungsprozesse in beiden Gruppen erfasst werden.

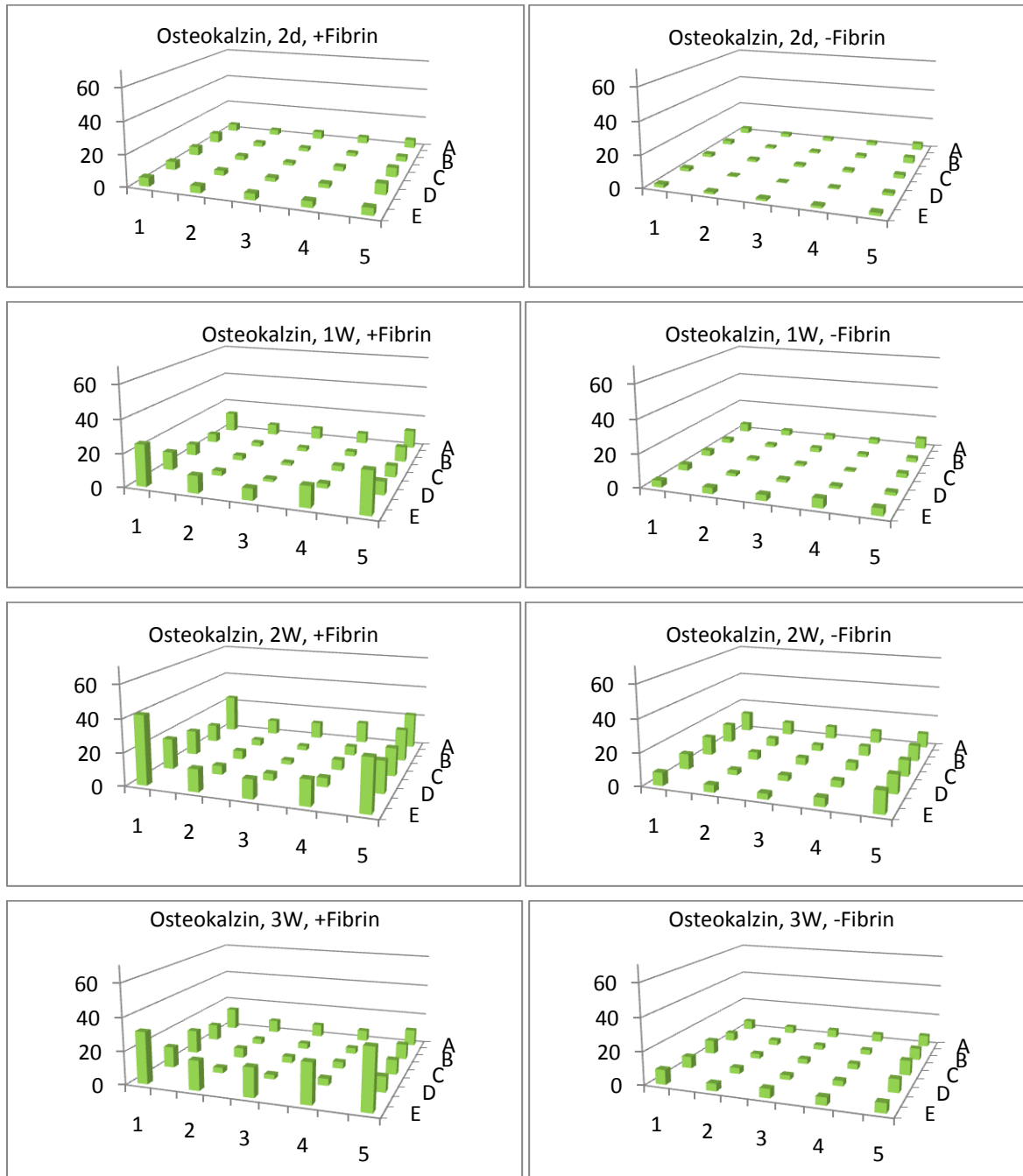


Abb.25: Quantitative Verteilung der Differenzierung (Osteokalzin); 2d, 1W, 2W, 3W; mit/ohne Fibrin

## 3.2.2.2 Prozentuale Analyse

Um die Aussagekraft der gemessenen Differenzierungsmarker zu verbessern, wurden die Differenzierungen auf die jeweilige Zellzahl bezogen, und als prozentualer Wert der Zellzahl ermittelt. Die so gewonnene Verteilung zeigt insgesamt, über alle Zeitpunkte gemittelt, keine signifikante Verbesserung in der Gruppe mit Fibrin-Matrix (Abb.26).

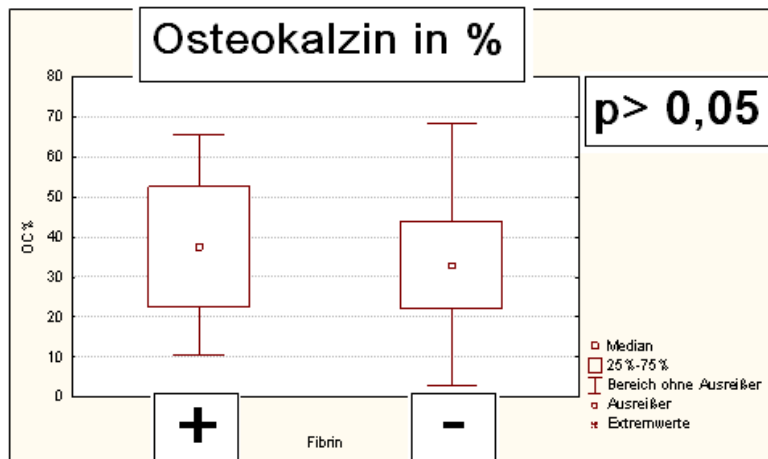
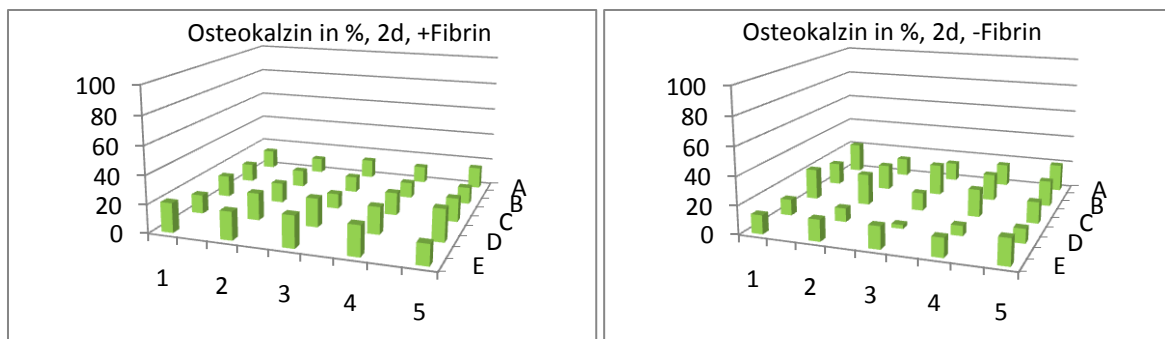


Abb.26: Vergleich der Differenzierung (Osteokalzin in % der Zellzahl) über alle Zeitpunkte, mit/ohne Fibrin

Die Betrachtungen der räumlichen Verteilung im Trägermaterial und das Verhalten der Differenzierung im Verlauf ergaben jedoch Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten. So zeigte sich hier wieder eine Betonung der Peripherie und vermehrte Differenzierung in bodennahen Regionen in beiden Gruppen. Besonders deutlich wird dies wieder zu den späteren Zeitpunkten nach der 2. und 3. Woche (Abb.27).



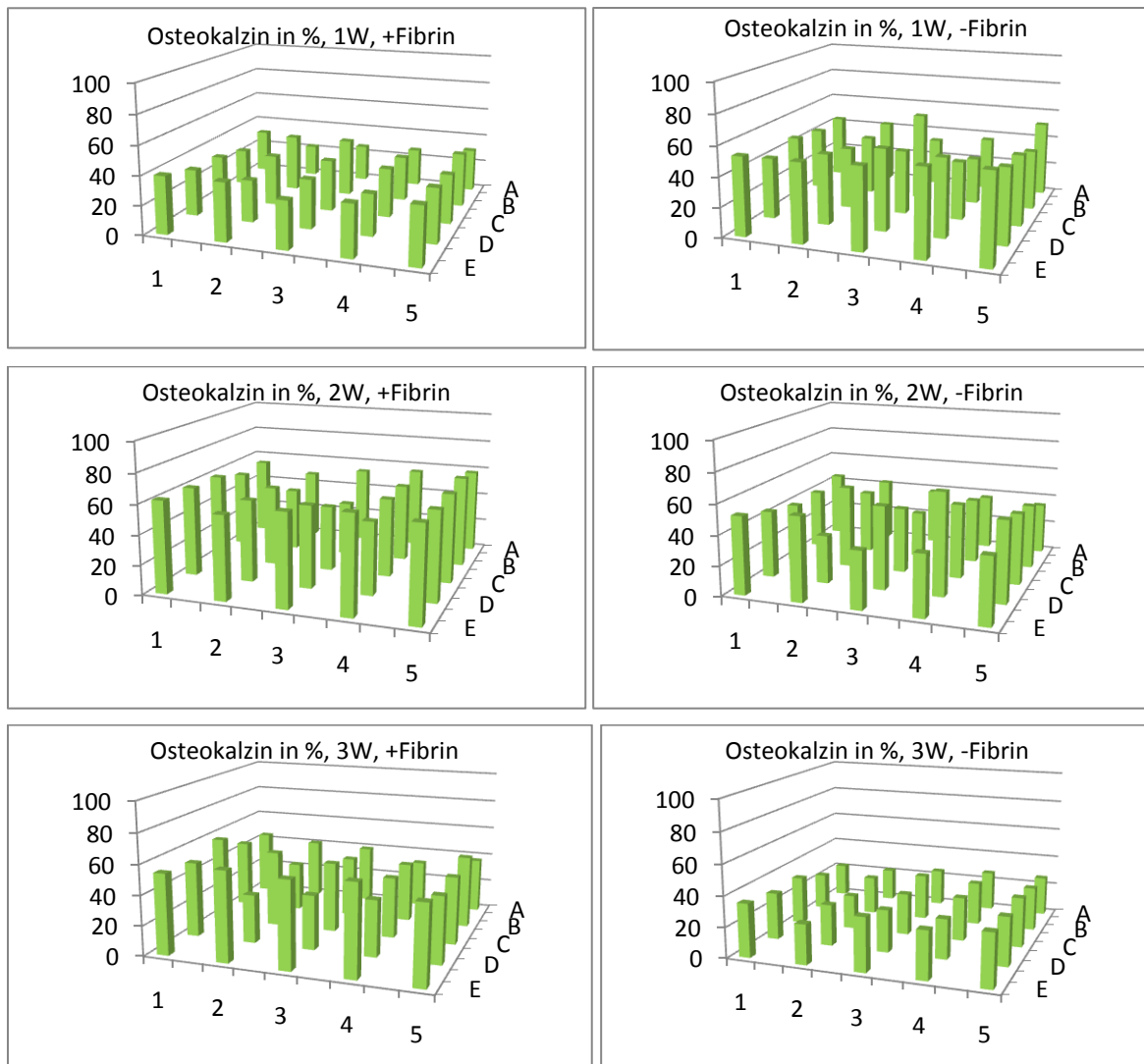


Abb.27: Prozentale Verteilung der Differenzierung (Osteokalzin); 2d, 1W, 2W, 3W; mit/ohne Fibrin

Außerdem schreitet die prozentuale Differenzierung bezogen auf die Zellzahl in der Gruppe ohne Fibrin zwar zunächst schneller voran, zeigt jedoch in der Gruppe mit Fibrin besonders zu späteren Zeitpunkten signifikant vermehrte Differenzierungen (Abb.28 und 29).

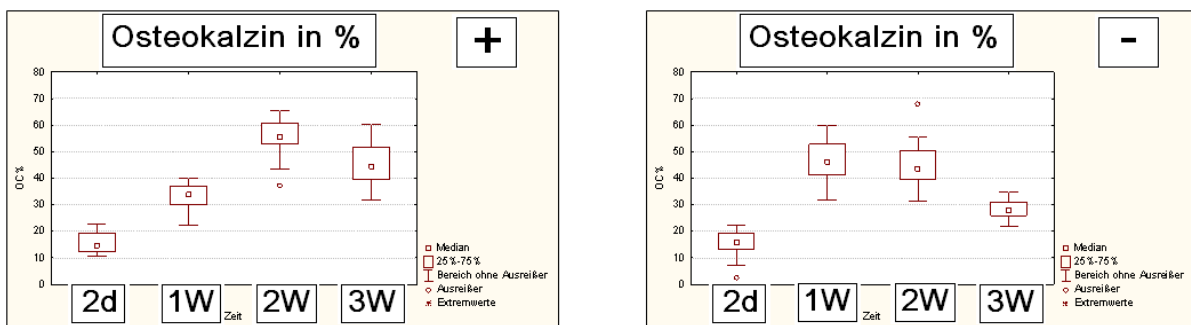


Abb.28: Vergleich der Differenzierung für Osteokalzin in % der Zellzahl zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W, mit/ohne Fibrin

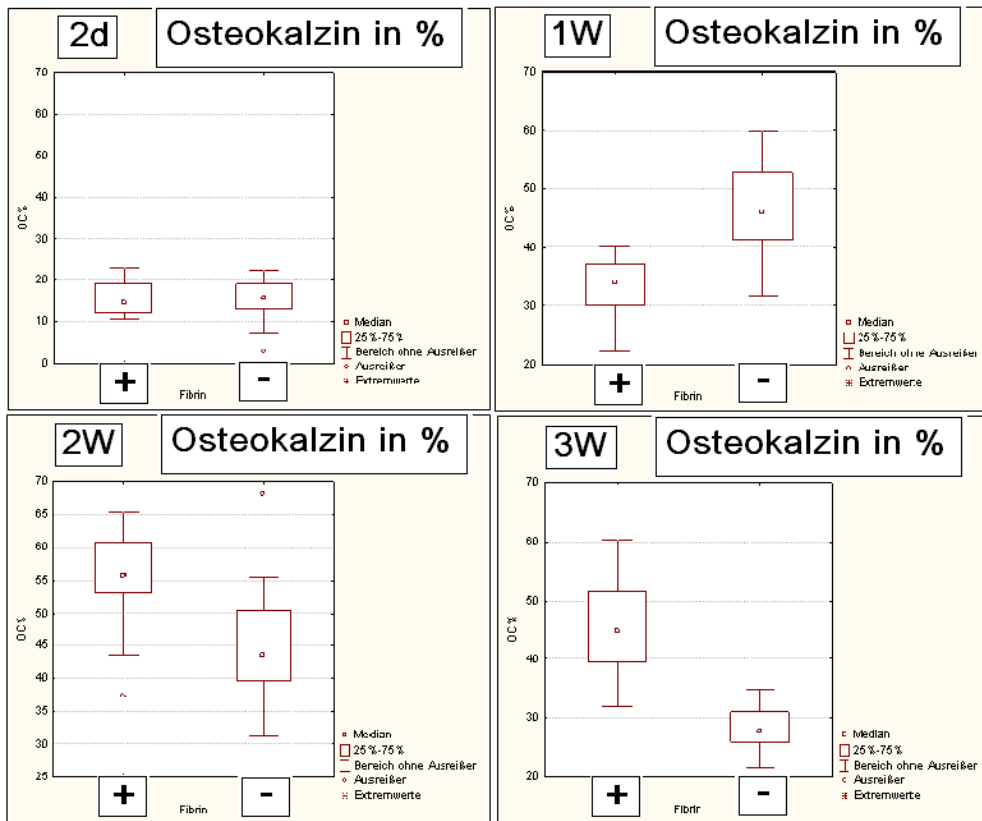


Abb.29: Vergleich des Differenzierungsmarkers Osteokalzin jeweils mit/ohne Fibrin zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W

### 3.2.3 Differenzierungsmarker VEGF

#### 3.2.3.1 Quantitative Analyse

Die quantitative Verteilung der VEGF-positiven Fluoreszenzmaxima verhält sich ähnlich der Osteokalzin-Erfassung und ergab ebenfalls signifikant vermehrte Registrierung in der Gruppe mit Fibrin, im Vergleich zu der Gruppe ohne Fibrin (Abb.30).

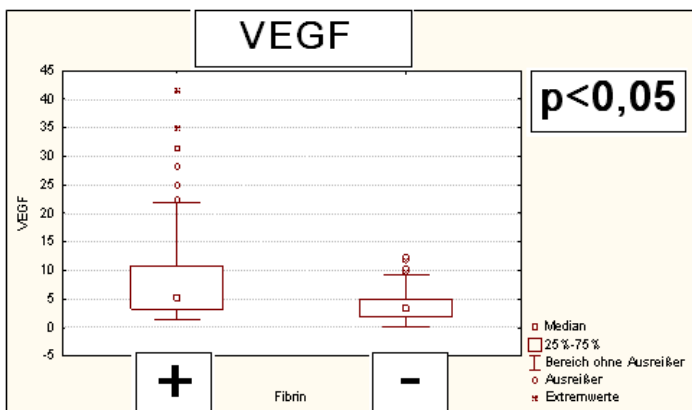


Abb.30: Vergleich der insgesamt registrierten Differenzierung für VEGF, mit und ohne Fibrin

Auch der Differenzierungsmarker VEGF zeigte in der Verteilung der quantitativen Erfassung eine vermehrte Registrierung in der Peripherie, eine Betonung der bodennahen Regionen (E 1-5) und in zentrumsnahen Regionen nur wenig positive Fluoreszenzmaxima (Abb. 31).

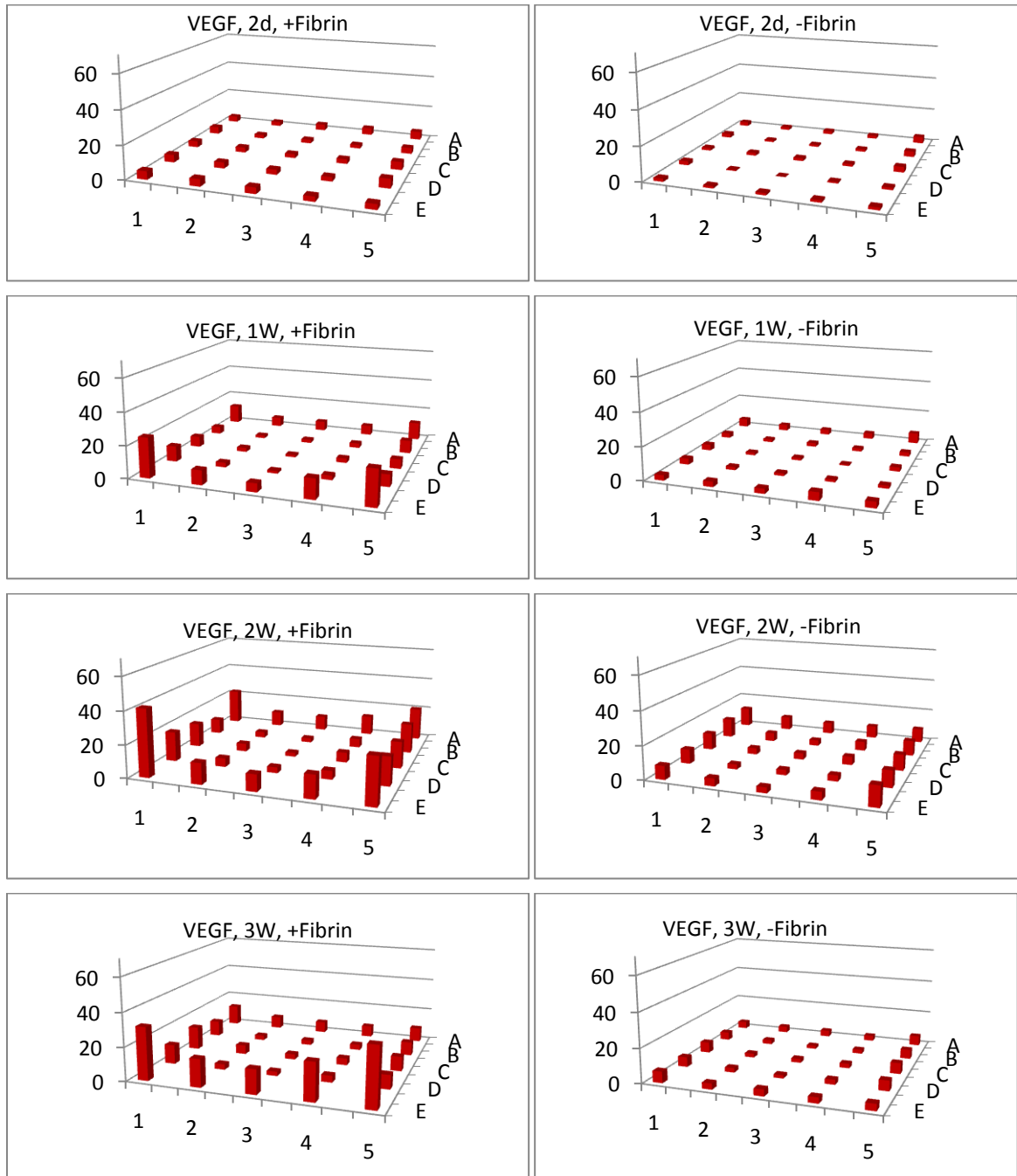


Abb.31: Quantitative Verteilung der Differenzierung (VEGF); 2d, 1W, 2W, 3W; mit/ohne Fibrin

## 3.2.3.2 Prozentuale Analyse

Der Differenzierungsmarker VEGF wurde ebenfalls mit der Zellzahl ins Verhältnis gesetzt und als prozentualer Wert ausgedrückt. Diese Betrachtung ergab, ähnlich der Verteilung von Osteokalzin, keine signifikante Verbesserung der insgesamt über alle Zeiträume gemittelten Werte in der Gruppe mit Fibrin-Matrix (Abb. 32).

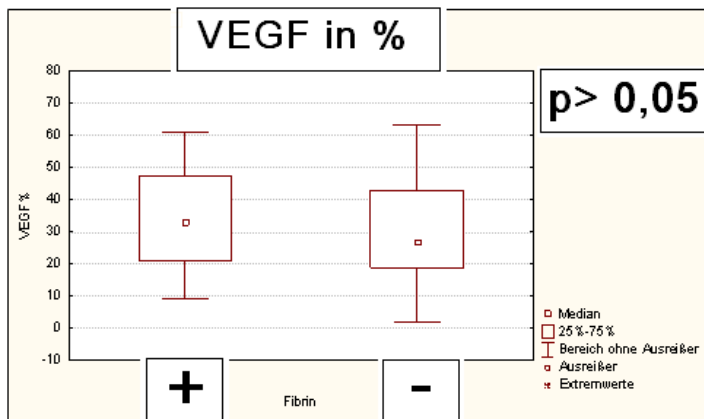
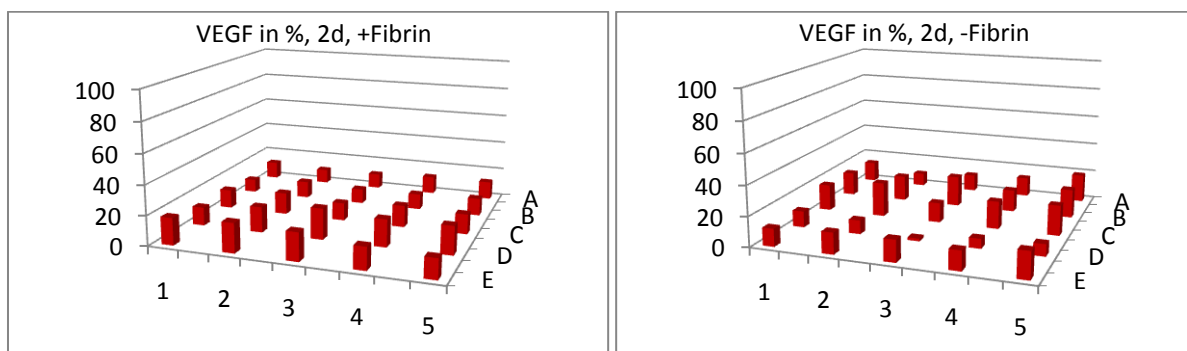


Abb.32: Vergleich der Differenzierung (VEGF in % der Zellzahl) über alle Zeitpunkte, mit/ohne Fibrin

Der Differenzierungsmarker VEGF zeigte wie Osteokalzin jedoch auch Unterschiede in der räumlichen Verteilung im Trägermaterial und im Verhalten der Differenzierung im Verlauf zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Wieder konnten wir eine vermehrte Differenzierung in der Peripherie und in bodennahen Regionen in beiden Gruppen erkennen. Auch hier wird dies deutlicher zu den späteren Zeitpunkten (Abb.33).





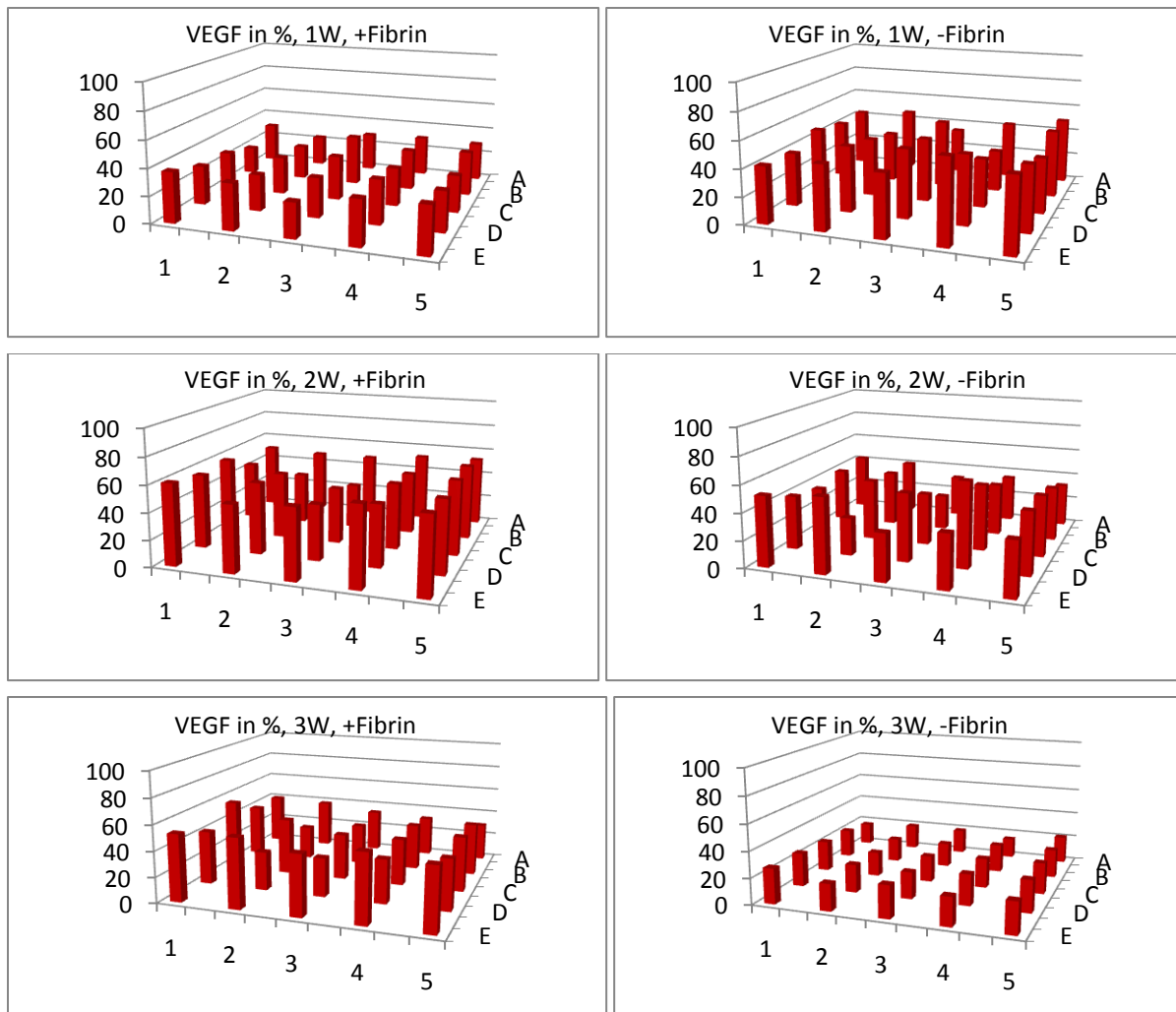


Abb.33: Prozentale Verteilung der Differenzierung (VEGF); 2d, 1W, 2W, 3W; mit/ohne Fibrin

Die prozentuale Differenzierung des Markers VEGF schreitet, ähnlich wie bei Osteokalzin, in der Gruppe ohne Fibrin zunächst schneller voran, und zeigt dann in der Gruppe mit Fibrin besonders zu späteren Zeitpunkten signifikant mehr Differenzierungen (Abb. 34 und 35).

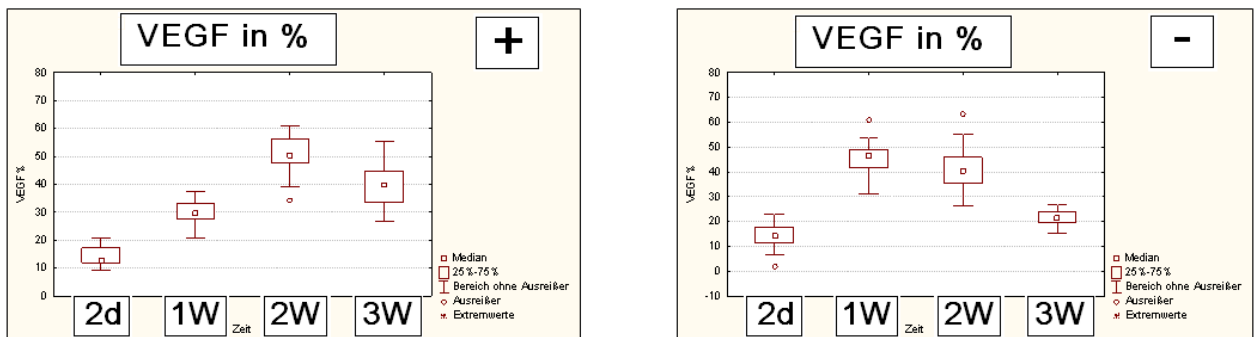


Abb.34: Vergleich der Differenzierung für VEGF in % der Zellzahl zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W, mit/ohne Fibrin

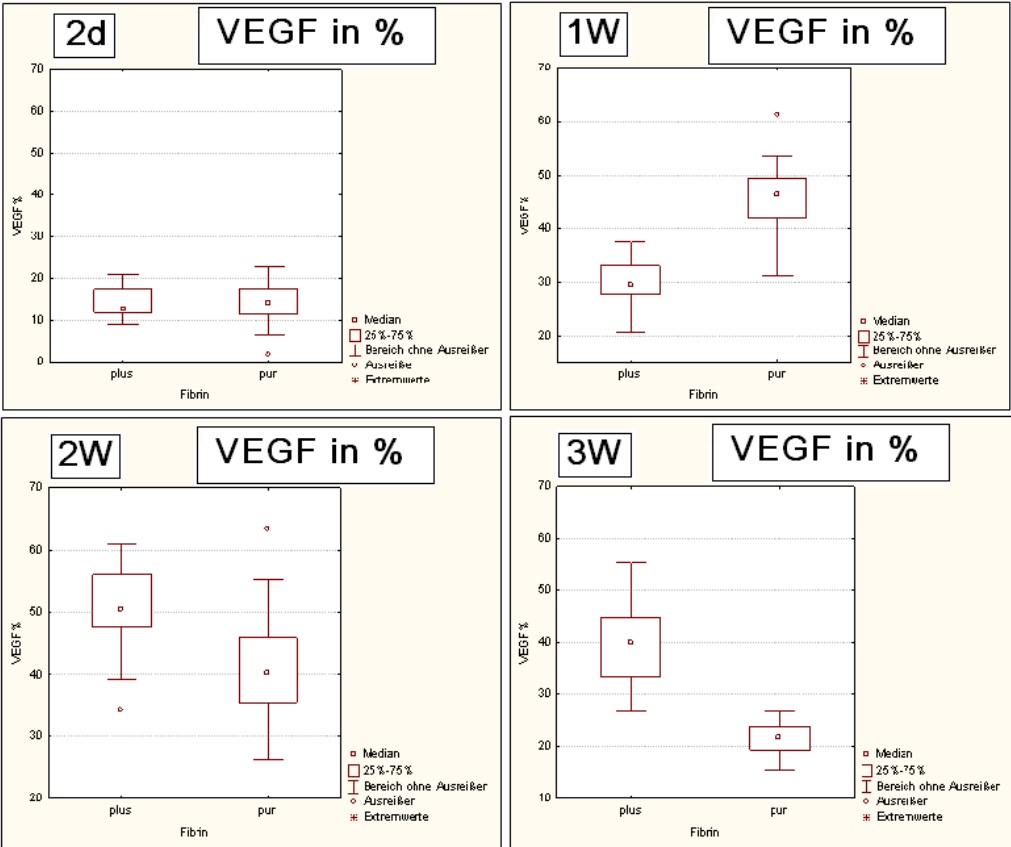


Abb.35: Vergleich des Differenzierungsmarkers VEGF in %, jeweils mit/ohne Fibrin zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W

#### 4. Diskussion

Die Nachfrage nach Knochenersatz wird durch die zunehmend älter werdende Bevölkerung und die damit verbundene Krankheits- und Unfallanfälligkeit des Knochensystems weiter steigen. Die Folgen von Tumorleiden, kongenitalen Anomalien, Entzündungen und Traumata bedeuten neben ästhetischen Beeinträchtigungen häufig auch einen erheblichen funktionellen Schaden. Um die Kontinuität und Funktion des Knochensystems wieder herzustellen, sind verschiedene Verfahren untersucht worden. Die autologe Knochentransplantation gilt bis heute als „Goldstandard“ in der Therapie von Knochendefekten (Moore et al. 2001). Da die bisher zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten jedoch Limitationen aufzeigen, kann die In-Vitro-Züchtung von Knochengewebe eine mögliche Alternative zur Versorgung bedeuten. Die Verwendung von humanen Knochenmarkstromazellen mit mesenchymalem Stammzellcharakter für die Regeneration von Gewebedefekten hat in den letzten Jahren große Hoffnung geweckt und leistet durch einfache Gewinnung und gute Proliferationseigenschaften in vitro, eine bedeutende Grundlage für das Tissue Engineering (Bruder und Fox 1999). Nach Isolation der Zellen aus der Biopsie und Expansion in der Zellkultur erfolgt die Besiedlung auf ein geeignetes Trägermaterial. Somit verfolgt Tissue Engineering das Ziel der Kombination von Ingenieurstechniken und biologischen Wissenschaften zur Regeneration von verloren gegangenem Gewebe. Wichtige Voraussetzung hierfür ist eine genügende Anzahl von Zellen für die dreidimensionale Kultivierung und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Trägermaterial, um homogenes Gewebe zu erzielen und die Differenzierung von Stammzellen zu Knochenzellen zu verbessern (Vunjak-Novakovic et al. 1998). Besonders die Optimierung der Besiedlung von dreidimensionalen Trägermaterialien war Gegenstand intensiver Forschung (Solchaga et al. 2006, Vunjak-Novakovic et al. 2005, Botchwey et al. 2001). Die begrenzte Anwendbarkeit dieser Techniken bei der Betrachtung von In-Vivo-Situationen, wo technischen Hilfsmitteln Grenzen gesetzt sind, erfordert jedoch eine Weiterentwicklung dieser Methode zur Steigerung von Besiedlungszahlen und Differenzierungsprozessen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Verwendung einer Fibrinmatrix zur Verbesserung der osteogenen Differenzierung von Knochenmarkstromazellen auf Kalziumkarbonat-Trägermaterialien bewertet werden. Die Besiedlung erfolgte unter statischen Bedingungen, jeweils mit und ohne den Zusatz von Fibrin. Nach festgelegten Zeitpunkten in Kultur wurden die Trägermaterialien entnommen, immunhistochemisch angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch mit dem ApoTome<sup>®</sup>-Modul ausgewertet.

## 4.1 Diskussion der Methode

### 4.1.1 Humane Knochenmarkstromazellen

Humane mesenchymale Stammzellen können als natürliche Quelle des menschlichen Körpers ein geeignetes Hilfsmittel für die regenerative Medizin darstellen. Stammzelltypische biologische Eigenschaften, wie fortlaufende Selbsterneuerung und die Möglichkeit zur Differenzierung in hoch spezialisierte mesodermale Zelllinien sind ihnen erhalten geblieben (Pittenger et al. 1999). Die Zellen sind in verschiedenen Geweben zu finden, zeichnen sich jedoch durch ein unterschiedliches Differenzierungspotential aus (Friedenstein et al. 1968). Neuere Studien mit Stammzellen aus geburtsassoziiertem Gewebe, wie z.B. Nabelschnurblut oder Plazentablut, deuten bereits Vorteile an, wie bessere Erreichbarkeit, einheitlichere Konsistenz und reichhaltigere Verfügbarkeit, ihre osteogene Differenzierungskapazität ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt (Hilfiker et al. 2011). In dieser Studie wurden humane Knochenmarkstromazellen verwendet, die ausschließlich aus Knochenmarksaspiraten eines adulten Spenders stammten. Diese eignen sich besonders als Ursprungsort für das Tissue Engineering, da sie eine hohe Aktivität zur Proliferation aufweisen und das Stadium der Entwicklung wenig weit fortgeschritten ist (Bertram et al. 2005). Knochenmarksaspirate enthalten eine komplexe Mischung von Zellen, sodass Diskussionen über die Heterogenität der Stammzellpopulation zur Festlegung von Mindestanforderungen für den Nachweis von Eigenschaften humaner mesenchymaler Stammzellen führten. Nach der „*International Society for Cellular Therapy (ISCT)*“ ist neben der Erfassung von Kunststoffadhärenz und Differenzierungspotential, die Oberflächencharakterisierung der verwendeten Zellen vorgesehen (Dominici et al. 2006). In der Zellkultur dieser Arbeit zeigten sich differenzierungsfähige und deutlich kunststoffadhärente Zellen, bei dessen Sortierung durch die FACS-Analyse die Antigenexpressionsmuster humaner mesenchymaler Stammzellen, wie CD 73, CD 90 und CD 105 nachgewiesen werden konnten, wobei hämatogene Oberflächenmarker wie CD 45 fehlten. Somit sprechen Adhärenzverhalten, Differenzierungspotential und Antigenexpressionsmuster für den Charakter von humanen mesenchymalen Stammzellen. Dennoch haben wir die Bezeichnung „humane Knochenmarkstromazellen“ beibehalten, da dessen Eigenschaften zwar deutlich auf einen mesenchymalen Stammzellcharakter hindeuten, jedoch ein endgültiger Beweis nach wie vor schwierig ist. Um mehr Sicherheit bei der Einschätzung von Differenzierungsvorgängen zu erzielen und eine wünschenswert einheitliche Terminologie für den Vergleich von Studienergebnissen zu erreichen, sind weitere Spezifizierungen dieser Gruppe von Zellen nötig.

#### 4.1.2 Trägermaterial für die dreidimensionale Zellkultur

Für die In-Vitro-Züchtung von Gewebestrukturen dient das Trägermaterial als Gerüst und bildet somit die Grundlage für die Entwicklung der Zellen, indem es die natürliche Umgebung in vivo temporär zu imitieren versucht. Die hieran gestellten Anforderungen gelten als Voraussetzung für Proliferation und Differenzierung und berücksichtigen Faktoren wie Besiedlungseigenschaften, Porosität, Interkonnektivität, Oberflächen-Volumen-Verhältnis, Porengröße, Biokompatibilität und Degradationseigenschaften (Chan und Leong 2008, Salgado et al. 2004, Yang et al. 2001, Boyan et al. 1996)

Das in dieser Arbeit verwendete Gerüstmaterial Biocoral ist ein poröses korallines Trägermaterial. Seine Vorteile liegen in präziser Architektur und Mikrostruktur. Es zeigt die Fähigkeit zur Anheftung von Zellen, ist belastungsstabil und biokompatibel. Darüber hinaus leistet es mit einer Porosität von 75% und einer Porengröße von 200-300 µm gute architektonische Eigenschaften, um Zellmigration, Adhäsion und Proliferation zu verbessern. Zusätzlich ist es vollständig resorbierbar und kann nach möglicher Implantation in vivo durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden (Soost 1998).

Diese Voraussetzungen machen Biocoral zu einem geeigneten Trägermaterial für die dreidimensionale Expansion von Knochenmarkstromazellen und erfüllen weitgehend die Anforderungen, die an ein Gerüstsystem gestellt werden.

#### 4.1.3 Besiedlung der Trägermaterialien

Für das Erreichen einer hohen Besiedlungsdichte und einer homogenen Verteilung von Zellen im dreidimensionalen Trägermaterial, ist die Optimierung von Besiedlungstechniken von entscheidender Bedeutung (Vunjak-Novakovic et al. 1998).

Grundsätzlich kann man zwischen statischen und dynamischen Verfahren der Kultivierung unterscheiden. Dynamische Besiedlungsmethoden realisiert durch verschiedene Formen von Bioreaktoren, durch Verwendung von Unterdruck- und Vakuumsystemen, sowie durch Besiedlung unter hydrostatischem Druck, haben bereits gute Ergebnisse bei der Verbesserung von Besiedlungszahlen und Besiedlungshomogenität gezeigt (Vunjak-Novakovic et al. 2005, Wang et al. 2006, Solchaga et al. 2006, Hess et al. 2010).

So wird die Besiedlungseffizienz mit statischen Methoden in der Literatur im Vergleich zu dynamischen Besiedlungsmethoden in vitro zwar als insgesamt weniger effektiv angegeben (Burg et al. 2000), deren Weiterentwicklung besitzt jedoch den Vorteil, dass nicht nur die Anzüchtung im Labor gelingt, sondern darüber hinaus eine mögliche Überführung in eine In-Vivo-Situation erleichtert werden kann (Schliephake et al. 2009).

Durch Verwendung einer Fibrinmatrix war es beispielsweise bereits möglich, eine deutliche Steigerung der Besiedlungseffizienz eines *in vitro* kultivierten Trägers unter statischen Bedingungen zu erzielen (Zhu et al. 2010).

Die therapeutische Anwendung von Fibrin ist bisher vor allem im Bereich der Wundheilung verbreitet, wo es als Leitstruktur für die Regeneration von Gewebedefekten dient. Seine Bedeutung für das Tissue Engineering von Knochen und die Stimulation der Osteogenese konnten bereits in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden (Catelas et al. 2006, Abiraman et al. 2002).

Auch in dieser Studie war es möglich, eine Verbesserung der Besiedlungszahlen durch eine Fibrinmatrix zu erreichen. So registrierten wir in der Gruppe mit Fibrin zu allen Zeitpunkten der Erfassung mehr Zellen im Biocoral-Trägermaterial.

Abgesehen von der Anzahl der Zellen, die nach Besiedlung im Träger haften bleiben, ist eine möglichst gleichmäßige Verteilung im Gerüst erforderlich, damit eine kontinuierliche Durchbauung des Biomaterials erfolgen kann.

Bezüglich der regionalen Verteilung der Zellen zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Homogenität der Besiedlung durch die Verwendung einer Fibrinmatrix. Das Bild der Zellverteilung ergab eine deutlich höhere Anzahl von Zellen in peripheren Bereichen des Trägers, wobei sich zentrale Regionen eher zellarm darstellten. Dieses Muster konnte zu jedem der vier Auswertungszeitpunkte erhoben werden (Abb. 36).

Der Vergleich mit anderen Arbeiten in Bezug auf Zellzahlen und Besiedlungshomogenität zeigt, dass das Potential der statischen Besiedlungstechnik in Verbindung mit einer Fibrin-Matrix nicht vollständig ausgeschöpft werden konnte. Die erfasste Anzahl und die gleichmäßige Verteilung der Zellen nach der Besiedlung lagen unterhalb der durch Zhu et al. bereits gezeigten Möglichkeiten (Zhu et al. 2010).

Ursachen hierfür können an verschiedenen Stellen vermutet werden. Zum einen müssen individuelle Unterschiede in Überlebens- bzw. Widerstandsfähigkeit und Wachstumspotenz der gewonnenen Knochenmarkstromazellen berücksichtigt werden. So ist bereits bekannt, dass die Stammzellen mit dem Alter an Proliferations- und Differenzierungspotenz abnehmen, wodurch eine Abweichung von Ergebnissen anderer Studien mit humanen mesenchymalen Stammzellen verschieden alter Patienten zustande kommen könnte (Oreffo et al. 1998).

Zum anderen kann eine veränderte Konsistenz der verwendeten Fibrin-Matrix durch zeitliche Verzögerung der Beimpfung des Trägers mit der Zell-Fibrin-Suspension zum Tragen kommen. So zeigte sich das Fibrin-Zell Gemisch zum Zeitpunkt der Besiedlung sehr zähflüssig, was eine bereits weit fortgeschrittene Polymerisation des Fibrin-Thrombin-Komplexes bedeutete. Hierdurch kann die Durchdringung von zentral gelegenen Bereichen erschwert werden, und die Zellen lagern sich, wie in unserem Versuch beobachtet, eher in

der Peripherie der Trägermaterialien ab, unter Aussparung von zentralen Regionen. Durch Veränderung der Konzentrationen von Fibrin und Thrombin, sowie durch zeitnahe Beimpfung des Trägermaterials mit der Zell-Fibrin-Suspension könnte dieser Effekt verringert werden, ohne auf die zelladhärente Wirkung des Fibrin zu verzichten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die vorgestellte Methode der statischen Besiedlung mit einer Fibrinmatrix eine Verbesserung der Zellzahlen bestätigt werden konnte, wobei allerdings Zellzahlen, die sich nach der Besiedlung im Träger nachweisen lassen, sowie die Homogenität der dreidimensionalen Verteilung der Zellen im Träger in weiteren Studien optimiert werden sollten.

#### 4.1.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit dem ApoTome<sup>®</sup>

Für die In-Vitro-Kultivierung von Knochenzellen werden häufig poröse mineralisierte Trägermaterialien eingesetzt, deren mangelnde Transluzenz die Möglichkeiten der Bildanalyse einschränkt. Somit bedeutet die Darstellung und Auswertung von zellulären Prozessen im Trägergerüst eine Herausforderung, da Artefakte durch Eigenfluoreszenzen oder Streulicht auftreten und Zellen durch Gerüststrukturen verdeckt werden können. In Studien zur Auswertung von Zellverteilungen in Trägermaterialien wurden verschiedene Methoden zur Bilddarstellung verwendet. So kommen Elektronenmikroskopie, Konfokale Laser-Scanning- Mikroskopie, Mikro-Computer Tomographie, konventionellen Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz (Tan et al. 2007).

Besonders neuere Entwicklungen auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen die kontinuierliche Erfassung von optischen Schnitten durch eine dreidimensionale Struktur (Gramann et al. 2009).

Auch in dieser Studie wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden, optisches Schneiden und zusätzlich die Anwendung der Axiovision-Bildanalyse-Software eingesetzt, um somit die Zellzahl und die Differenzierungsmarker Osteokalzin und VEGF zu den verschiedenen Zeitpunkten in dem Biocoral-Träger zu untersuchen. Mit diesem Prinzip der Bilderfassung, konnten die Poren der Trägerschnitte bis in eine Tiefe von 120 µm von der Oberfläche schichtweise sichtbar gemacht werden. Die Reduzierung von Überlagerungsphänomenen konnte die Bildqualität deutlich steigern und zelluläre Strukturen in der Tiefe erst sichtbar machen (Abb. 15). So konnten wir auf der Oberfläche der Biocoral-Träger um die blau angefärbten Zellkerne herum Osteokalzin und VEGF-positive Zellkörper mit Fortsätzen darstellen (Abb. 16, 18).

Die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI erfolgte überwiegend problemlos. Eigenfluoreszenzen waren kaum vorhanden, was die Bearbeitung durch die Axiovision-Software erleichterte. Für

die Erfassung der Differenzierungsmarker Osteokalzin und VEGF, bei denen das Biocoral-Trägermaterial deutlichere Eigenfluoreszenzen zeigte, galt folgende Voraussetzung: Berücksichtigt wurden nur die Fluoreszenzen, die sich in einem definierten Radius um einen registrierten Zellkern befanden und oberhalb der jeweils definierten Eigenfluoreszenz des Trägermaterials lagen. Artificielle Anfärbungen, besonders an den Randbereichen der mit Fibrin besiedelten Träger, wurden manuell aus der Erfassung entfernt. Die Auszählung erfolgte automatisch, wurde jedoch stichprobenweise manuell überprüft. Mit dieser Methode der bildlichen Darstellung konnten somit nicht nur Zellkerne sichtbar gemacht, sondern auch Differenzierungsvorgänge im Träger dargestellt werden. Zusätzlich war es möglich, die abgebildeten Fluoreszenzmaxima mit der Axiovision-Bildanalyse-Software quantitativ zu erfassen. Die Fluoreszenzmikroskopie in optischen Schnitten (ApoTome<sup>®</sup>) ist somit ein geeignetes Verfahren für die Darstellung und Erfassung von Differenzierungsvorgängen in mineralisierten dreidimensionalen Trägermaterialien.

#### 4.2 Bewertung der Ergebnisse

Wie bereits dargestellt, zeigte die Auswertung der erfassten Zellkerne eine Steigerung der Besiedlung durch die Verwendung einer Fibrinmatrix, wobei eine Verbesserung der gleichmäßigen Verteilung im Träger nicht nachgewiesen werden konnte.

Bei Betrachtung der Differenzierungsmarker zeigte sich, dass die Expression von VEGF und Osteokalzin bereits ab dem 2. Tag in Kultur beginnend und über den kompletten Verlauf der Kultur anhaltend sehr ähnlich verläuft, was eine Koexpression von VEGF und Osteokalzin vermuten lässt. Auch wenn es sich bei den Erfassungen um sehr frühe Markerexpressionen handelt, widersprechen sie jedoch nicht dem molekularen Profil von Osteoprogenitorzellen. So untersuchten Smith et al. die sequentielle Expression von knochenrelevanten Wachstums- und Transkriptionsfaktoren an aus dem Knochenmark stammenden Osteoprogenitorzellen auf alloplastischen Knochenscheiben durch *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). Der Nachweis osteogener Differenzierungsmarker erfolgte bereits nach Beginn der Adhäsion der Zellen im Träger, mit Expressionspeaks für Osteokalzin am 4. Tag und für VEGF am 8. Tag (Smith et al. 2010). Somit exprimieren Knochenvorläuferzellen *in vitro* zumindest phasenweise gleichzeitig VEGF und Osteokalzin, das Expressionsmuster zeigt einen ähnlichen Verlauf mit verschiedenen Peak-Zeitpunkten.

Bei der Betrachtung der insgesamt erhobenen Differenzierungsvorgänge ergaben sich in der Gruppe mit Fibrinmatrix quantitativ signifikant vermehrte Expressionen von VEGF und Osteokalzin im Vergleich zur Gruppe ohne Fibrin. Unter Berücksichtigung der Zellzahl



wurden die registrierten Differenzierungen als prozentualer Wert angegeben und ergaben insgesamt über alle Zeitpunkte gemittelt jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Gruppe mit Fibrin gegenüber der Gruppe ohne. Eine zunächst angenommene Verbesserung der Differenzierung durch die Verwendung einer Fibrinmatrix konnte somit bei der insgesamt erhobenen Erfassung nur teilweise bestätigt werden. Die Aussage, die nach dieser Betrachtung getroffen werden kann, bedeutet zunächst nur, dass mehr Zellen auch mehr VEGF und Osteokalzin exprimieren. Der fördernde Effekt der initialen Zelldichte auf die Differenzierung durch parakrine und autokrine Stimulation ist in der Literatur bereits lange bekannt (Friedenstein et al. 1966) und konnte somit bestätigt werden.

Zur genaueren Betrachtung ermittelten wir die im Intervall pro Träger gemessenen Expressionen von VEGF und Osteokalzin in Prozent, bezogen auf die Zellzahl zu den verschiedenen Zeitpunkten. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede (Abb. 28, S. 52; Abb. 34, S. 56). Die Differenzierung schritt in der Gruppe mit Fibrin sowohl für den Marker Osteokalzin, als auch für den Marker VEGF zwar zunächst langsamer voran, zu den späteren Zeitpunkten, also nach der 2. bzw. 3. Woche, lag die Differenzierung jedoch signifikant über der Differenzierung, die in der Gruppe ohne Fibrin gemessen wurde. Dieser sprunghafte Anstieg von VEGF und Osteokalzin nach der 2. Woche spricht zwar für eine verspätete, jedoch verstärkte Differenzierung zu diesem Zeitpunkt. Nach einem Maximalwert in der Gruppe mit Fibrin in der 2. Woche und in der Gruppe ohne Fibrin in der 1. Woche zeigte sich eine abfallende Tendenz in beiden Gruppen.

Ursachen für diesen Verlauf können in der Tatsache begründet sein, dass die Proliferationsdauer nach Besiedlung der Träger in der Gruppe mit Fibrinmatrix länger anzudauern scheint, wodurch die Differenzierung langsamer einsetzt. Hinzu kommt der direkte Einfluss der Fibrinmatrix auf die zelluläre Entwicklung. Abiraman et al. untersuchten bereits im Tierversuch die osteoinduktiven Eigenschaften von Fibrin in Verbindung mit verschiedenen Biomaterialien und konnten einen positiven Effekt des Fibrins als potentes osteoinduktives Gewebe-Adhäsiv feststellen (Abiraman et al. 2002). Ein in der Literatur beschriebener stimulierender Effekt von Fibrin auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen konnte somit bei Betrachtung der insgesamt ermittelten Zellzahlen zumindest zu den späteren Zeitpunkten (2W und 3W) bestätigt werden. Für eine weitergehende Betrachtung der Expression von osteogenen Markern müsste die Dauer der Erfassung verlängert werden, um den weiteren Verlauf der Marker VEGF und Osteokalzin beurteilen zu können.

Bezüglich der räumlichen Verteilung der registrierten Expression von VEGF und Osteokalzin zeigte sich mit und ohne Fibrin ein ähnliches Muster. Wir konnten feststellen, dass die quantitative Erfassung zwar wieder abhängig von der Zellzahlverteilung keine Gleichmäßigkeit über den Träger hinweg erreichen konnte, die Betonung der Peripherie also

wieder Ausdruck einer inhomogenen Besiedlung war. Die auf die Zellzahl bezogene prozentuale Erfassung bildete jedoch sowohl in der Peripherie als auch im Zentrum besonders zu den frühen Zeitpunkten (2d, 1W) gleichmäßige Expression von VEGF und Osteokalzin ab.

In der Gruppe der quantitativen Erfassung konnte somit ein bereits in der Literatur beschriebener Nährstoffgradient von der Oberfläche bis hin in das Zentrum des Trägers für proliferative Prozesse nachvollzogen werden (Glowacki et al. 1998), der den Zellen ein Überleben in der Tiefe des Trägers bis zu 200-300 µm ermöglicht, darüber hinaus jedoch mit rein diffusionsgestützter Versorgung nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Ishaug-Riley et al. 1998). Die Auswirkung der begrenzten Nährstoffversorgung auf die Expression von Differenzierungsmarkern scheint erst zu den späteren Beobachtungszeitpunkten (2W, 3W) zum Tragen zu kommen. So ergeben sich bis zur 1. Woche in Kultur noch gleichmäßige Verteilungen der prozentual erfassten Expression von VEGF und Osteokalzin (Abb. 37, S. 87; Abb. 38, S. 88). Später hingegen konnte ein Überwiegen von Expressionsprozessen für VEGF und Osteokalzin in der Peripherie beobachtet werden (Abb. 37, S. 87; Abb. 38, S. 88). Nach der Proliferation der Zellen an der Oberfläche der Träger erfolgt neben der Differenzierung die Matrixproduktion. Obwohl der direkte Nachweis extrazellulärer Knochenmatrix durch Färbung von Kollagen Typ I in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde, kann durch die vermehrte Registrierung von Osteokalzin als Knochenmarkerprotein und Bestandteil der extrazellulären Matrix, eine Steigerung der Matrixproduktion vermutet werden. So zeigt sich im Verlauf der Erfassung eine zunehmende Ausfüllung der Porenstruktur des Trägermaterials durch Osteokalzin-positives Material (Abb. 20, S. 47). Mit den eingesetzten Antikörpern war es allerdings nicht möglich, einen spezifischen Nachweis wichtiger Matrix-Bestandteile zu führen. Dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

#### 4.3 Ausblick

Der Grundgedanke des Tissue Engineering zielt darauf ab, im Labor künstlich Gewebe zu kultivieren, um es anschließend zum Ersatz autologer Transplantationen einzusetzen. Nach anfänglicher Euphorie in diesem Forschungsgebiet wurde jedoch schnell deutlich, dass sich der menschliche Regenerationsmechanismus im Labor nur in Ansätzen abbilden lässt, wobei viele komplexe Mechanismen von intra- und extrazellulären Signalwegen und Stimuli, sowie die Interaktion mit einem Biomaterial als extrazellulärer Matrix noch nicht vollkommen verstanden sind. Die Bedeutung von Stammzellen und ihre Rolle in der Kultivierung bilden das grundlegende Fundament, um die Ergebnisse von In-Vitro-Studien in den klinischen

---

Alltag zu überführen. Die Ergebnisse dieser Studie können erneut dazu beitragen, den Prozess der Knochenentwicklung besser zu verstehen und seine Entwicklung im Labor besser nachzuvollziehen. Von einer umfassenden Methode zur Knochenentwicklung im Labor sind wir trotzdem noch weit entfernt.

Nerem beschrieb die Entwicklung des Tissue Engineering in den letzten Jahren und fasste seine Einschätzung bezüglich der Aussichten in einer Übersichtsarbeit zusammen. Er beschrieb Tissue Engineering als ein von der Gesellschaft gefeiertes Wissenschaftsfeld, das trotz eingetretener Ernüchterung Erzeugnisse hervorgebracht hat, die dem Patienten helfen können, jedoch noch nicht den Hoffnungen gewachsen ist, die an seine Möglichkeiten gestellt werden (Nerem 2006).

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob die Besiedelung eines Trägermaterials mit humanen Knochenmarkstromazellen in Kombination mit einer Fibrinmatrix zu einer Verbesserung der Differenzierung von Zellen im Vergleich zur Besiedelung ohne Fibrinmatrix führt. Darüber hinaus wurde die dreidimensionale Verteilung der Zellen und ihrer exprimierten Differenzierungsmarker im Träger unter Berücksichtigung der beiden Besiedelungstechniken mittels Fluoreszenzmikroskopie und optischen Schnitten analysiert.

Zwei Gruppen von Kalziumkarbonatgerüsten wurden mit humanen Knochenmarkstromazellen statisch besiedelt, wobei eine Gruppe der Träger mit einer Fibrinogen-Lösung beimpft wurde. Zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W und 3W in Kultur wurden die Proben durch den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie in optischen Schnitten dreidimensional ausgewertet, und die Zellzahl mit ihrer dreidimensionalen Verteilung anhand der Markierung der Zellkerne (DAPI) beurteilt, sowie der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, der positiv für Osteokalzin und VEGF markiert war.

Die Auswertung zeigte eine signifikant höhere Zellzahl in der Gruppe mit Fibrinmatrix zu allen Zeitpunkten. Zudem ergab die prozentual erfasste Registrierung von VEGF und Osteokalzin eine zunächst langsamer einsetzende, nach der 2. Woche jedoch signifikant vermehrte Expression für beide Marker. Die räumliche Streuung dieser Erfassung war zunächst gleichmäßig über das Trägermaterial verteilt, zeigte jedoch nach der 2. Woche eine deutliche Betonung der Peripherie.

Neben dem positiven Einfluss auf die Zellzahl hat die Fibrinmatrix auch einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung von humanen Knochenmarkstromazellen und die Expression angiogener Faktoren in besiedelten Kalziumkarbonatgerüsten.

---

**6. Literaturverzeichnis****Abiraman S, Varma HK, Umashankar PR, John A (2002):**

Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 23, 3023-3031

**Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM (2001):**

Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276, 20316-20322

**Alison M R, Poulson R, Otto WR, Vig P, Brittan M, Direkze NC, Lovell M, Fang TC, Preston SL, Wright NA (2004):**

Recipes for adult stem cell plasticity: fusion cuisine or readymade? *J Clin Pathol* 57, 113-120

**Artzi Z, Nemcovsky CE, Tal H (2001):**

Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21, 395-405

**Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M (1980):**

Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 151, 294-307

**Aubin JE (1998):**

Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 30, 73-82

**Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME (1986):**

Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *J Cell Sci* 84, 139-151

**Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG (2000):**

Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res* 17, 497-504

**Bauer TW, Muschler GF (2000):**

Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 371, 10-27

**Benninghoff A, Drenckhahn D:**

*Makroskopische Anatomie*, 17. Auflage; Urban & Fischer, München, Jena 2008

**Beresford JN (1989):**

Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 240, 270-280

**Bertram H, Mayer H, Schliephake H (2005):**

Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone. *Clin Oral Implants Res* 16, 524-531

**Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT (2001):**

Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J Biomed Mater Res* 55, 242-253

**Botchwey EA, Pollack SR, El-Amin S, Levine EM, Tuan RS, Laurencin CT (2003):**

Human osteoblast-like cells in three-dimensional culture with fluid flow. *Biorheology* 40, 299-306

**Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z (1996):**

Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17, 137-146

**Brighton CT, Strafford B, Gross SB, Leatherwood DF, Williams JL, Pollack SR (1991):**

The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *J Bone Joint Surg Am* 73, 320-331

**Bruder SP, Fox BS (1999):**

Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res* 367, 68-83

**Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997):**

Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-294.

**Burg KJ, Holder WD Jr, Culberson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loeb sack AB, Roland WD, Eiselt P, Mooney DJ, Halberstadt CR (2000):**

Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res* 52, 642-649

**Burger EH, Klein-Nulend J (1999):**

Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 13, 101-112

**Canalis E (1996):**

Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3441-3447

**Caplan AI (2007):**

Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341-347

**Caplan AI, Bruder SP (2001):**

Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7, 259-264

**Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA (1980):**

Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56, 289-301

**Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B (2006):**

Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12, 2385-2396

**Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1991):**

Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 73, 1418-1428

**Centrella M, Casinghino S, Ignatz R, McCarthy TL (1992):**

Multiple regulatory effects by transforming growth factor-beta on type I collagen levels in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 131, 2863-2872

**Chai Y, Maxson RE Jr (2006):**

Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn* 235, 2353-2375

**Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007):**

Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749

**Chan BP, Leong KW (2008):**

Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 17, 467-479

**Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR, Roodman GD (1988):**

Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5683-5687

**Chunmeng S, Tianmin C (2004):**

Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplant Proc* 36, 1578-1581

**Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Marsh DR (2007):**

Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone* 40, 939-947

**Cordeiro PG, Disa JJ, Hidalgo DA, Hu QY (1999):**

Reconstruction of the mandible with osseous free flaps: a 10-year experience with 150 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg* 104, 1314-1320

**Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG (1995):**

Bone tissue engineering. *Nat Med* 1, 1322-1324

**Dahlin C, Alberius P, Linde A (1991):**

Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg* 74, 487-491

**De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP (2003):**

Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 160, 909-918

**De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T (2007):**

Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89, 649-658

**Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E (2006):**

Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317

**Dong J, Uemura T, Kojima H, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T (2001):**

Application of low-pressure system to sustain in vivo bone formation in osteoblast/porous hydroxyapatite composite. *Mat Sci Eng* 17, 37- 43

**Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, von Garrel T, Gotzen L (2005):**

Wilke A. Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts--an "in vitro" analysis of immunomodulation. *Orthop Ihre Grenzgeb* 143, 660-668

**Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW (2005):**

Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 16, 981-989

**Felice P, Marchetti C, Iezzi G, Piattelli A, Worthington H, Pellegrino G, Esposito M (2009):**

Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs. bovine anorganic bone. Clinical and histological results up to one year after loading from a randomized-controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 20, 1386-1393

**Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998):**

Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530

**Finkemeier CG (2002):**

Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84, 454-464

**Flemming AF, Brough MD, Evans ND, Grant HR, Harris M, James DR, Lawlor M, Laws IM (1990):**

Mandibular reconstruction using vascularised fibula. *Br J Plast Surg* 43, 403-409

**Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966):**

Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390

**Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968):**

Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247

**Gao TJ, Tuominen TK, Lindholm TS, Kommonen B, Lindholm TC (1997):**

Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral or tricalcium phosphate cylinders. *Biomaterials* 18, 219-223

**Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR (2008):**

The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res* 87, 1048-1052

**Glanstchnig H, Varga F, Rumpler M, Klaushofer K (1996):**

Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>): a potential mediator of c-fos expression induced by hydrostatic pressure in osteoblastic cells. *Eur J Clin Invest* 26, 544-548

**Glowacki J, Mizuno S, Greenberger JS (1998):**

Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture. *Cell Transplant* 7, 319-326

**Gosain AK, Persing JA (1999):**

Biomaterials in the face: benefits and risks. *J Craniofac Surg* 10, 404-414

**Gramann M, Wendler O, Haeberle L, Schick B (2009):**

Prominent collagen type VI expression in juvenile angiofibromas. *Histochem Cell Biol* 131, 155-164

**Grodzinsky AJ, Kamm RD, Lauffenburger DA:**

Quantitative aspects of tissue engineering: basic issues in kinetics, transport, and mechanics. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J eds: *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, San Diego 2000, 195- 206



**Guan K, Rohwedel J, Wobus AM (1999):**

Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30, 211-226

**Guo X, Zheng Q, Kulbatski I, Yuan Q, Yang S, Shao Z, Wang H, Xiao B, Pan Z, Tang S (2006):**

Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 1, 93-99

**Hahn W, Klotz S, Gruber RM:**

Knochenaufbau in der zahnärztlichen Implantologie: Allgemeine und operative Grundlagen Band 1, 1. Auflage; Spitta Verlag, Balingen 2008

**Hallman M, Lundgren S, Sennerby L (2001):**

Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res* 3, 87-96

**Harada S, Rodan GA (2003):**

Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355

**Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992):**

Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88

**Heinonen A, Sievänen H, Kyröläinen H, Perttunen J, Kannus P (2001):**

Mineral mass, size, and estimated mechanical strength of triple jumpers' lower limb. *Bone* 29, 279-285

**Hellem S, Olofsson J (1988):**

Titanium-coated hollow screw and reconstruction plate system (THORP) in mandibular reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg* 16, 173-183

**Hench LL, Wilson J (1984):**

Surface-active biomaterials. *Science* 226, 630-636

**Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M (2002):**

The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48, 1819-1827

**Hess R, Douglas T, Myers KA, Rentsch B, Rentsch C, Worch H, Shrive NG, Hart DA, Scharnweber D (2010):**

Hydrostatic pressure stimulation of human mesenchymal stem cells seeded on collagen-based artificial extracellular matrices. *J Biomech Eng* 132, 021001

**Hidalgo DA (1991):**

Aesthetic improvements in free-flap mandible reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 88, 574-587

**Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A (2011):**

Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? *Langenbecks Arch Surg* 396, 489-497

**Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V (2004):**

The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4, 268-275

**Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990):**

The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1, 60-68

**Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D (1996):**

Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 324,55-65

**Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000):**

Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res* 51, 376-382

**Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy (2005):**

Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395

**Huh JY, Choi BH, Kim BY, Lee SH, Zhu SJ, Jung JH (2005):**

Critical size defect in the canine mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100, 296-301

**Hutmacher DW (2000):**

Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529-2543

**Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC (2007):**

State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 245-260

**In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE (2003):**

Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 88, 845-852

**Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG (1998):**

Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 19, 1405-1412

**Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V (2007):**

Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 53, 121-127

**Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997):**

Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312

**Jewer DD, Boyd JB, Manktelow RT, Zuker RM, Rosen IB, Gullane PJ, Rotstein LE, Freeman JE (1989):**

Orofacial and mandibular reconstruction with the iliac crest free flap: a review of 60 cases and a new method of classification. *Plast Reconstr Surg* 84, 391-405

**Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002):**

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49

**Junqueira LCU, Carneiro J:**

Histologie, 5. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg, New York 2002

**Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M (2002):**

Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 71, 36-44

**Kainer MA, Linden JV, Whaley DN, Holmes HT, Jarvis WR, Jernigan DB, Archibald LK (2004):**

Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med* 350, 2564-2571

**Katthagen BD, Scheffler S, Becker R, Willkomm D, Mayr HO, Pruß A (2008):**

Gewinnung, Prozessierung und Transplantation allogener muskuloskelettaler Gewebe. *Transfus Med Hemother* 35, 438-445

**Klein S, Hage JJ, Woerdeman LA (2005):**

Donor-site necrosis following fibula free-flap transplantation: a report of three cases. *Microsurgery* 25, 538-542

**Kolb HJ, Holler E (1997):**

Hematopoietic transplantation: state of the art. *Stem Cells* 15, 151-158

**Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000):**

Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234

**Lane JM, Tomin E, Bostrom MP (1999):**

Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 367, 107-117

**Langer R, Vacanti JP (1993):**

Tissue engineering. *Science* 260, 920-926

**Laurencin CT, Attawia MA, Elgendy HE, Herbert KM (1996):**

Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone* 19, 93-99

**LeGeros RZ (2002):**

Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 395, 81-98

**Lenzen C, Meiss A, Bull HG (1999):**

Augmentation of the extremely atrophied maxilla and mandible by autologous calvarial bone transplantation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3, 40-42

**Lian JB, Stein GS (1995):**

Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J* 15, 118-140

**Liu X, Ma PX (2004):**

Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 32, 477-486

**Long MW (2001):**

Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis* 27, 677-690

**Lüllmann- Rauch R:**

Histologie, 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006

**Lysaght MJ, Reyes J (2001):**

The growth of tissue engineering. *Tissue Eng* 7, 485-493

**Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2001):**

Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* 83, 121-128

**Martin RB (2007):**

Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as activation. *Bone* 40, 1574-1580

**Mayer H, Scutt A, Wingender E (1992):**

Differentiation of osteogenic cells: systems and regulators *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 130, 276-284

**Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000):**

Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782

**Minuth WW (1991):**

MINUSHEET - A new method for "natural" culture conditions of epithelia in vitro. *ALTEX* 8, 18-30

**Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998):**

Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res* 291, 1-11

**Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S (2000):**

Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 11, 495-522

**Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001):**

Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71, 354-361

**Murray DW, Rushton N (1990):**

The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method. *Calcif Tissue Int* 47, 35-39

**Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004):**

Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86, 1541-1558

**Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L (1994):**

Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res* 12, 70-78

**Nerem RM (1992):**

Tissue Engineering in the USA. *Med Biol Eng Comput* 30, 8-12

**Nerem RM (2006):**

Tissue engineering: the hope, the hype, and the future. *Tissue Eng* 12, 1143-1150

**Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, Kasten P, Seckinger A, Ho AD, Simank HG (2004):** Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 177, 68-78

**Ohishi M, Schipani E (2010):**

Bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 109, 277-282

**Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT (1998):**

Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)* 94, 549-555

**Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001):**

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705

**Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990):**

Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143, 420-430

**Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J (2002):**

Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *Clin Invest* 110, 751-759

**Phinney DG, Prockop DJ (2007):**

Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902

**Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999):**

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147

**Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R:**

Biochemie, 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008

**Rueger JM:**

Knochenersatzmittel. Hefte zur Unfallheilkunde; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1992

**Rueger JM (1998):**

Bone substitution materials. Current status and prospects. *Orthopade* 27, 72-79

**Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (1999):**

Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277, 628-637

**Sakai K, Mohtai M, Iwamoto Y (1998):**

Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells: modulation by cation channel blockades. *Calcif Tissue Int* 63, 515-520

**Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004):**

Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 9, 743-765

**Schliephake H (2002):**

Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 469-484

**Schliephake H:**

Tissue Engineering in Maxillofacial Surgery. In: Meyer U, Meyer T, Handschel J, Wiesmann HP: Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Vol. 57, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2009, 827-837

**Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, Wülfing T (2009):**

Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res A* 90, 429-437

**Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009):**

Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications. *Unfallchirurg* 112, 785-795

**Schmitz JP, Hollinger JO (1986):**

The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205, 299-308

**Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, Carnes DL, Goldstein M, Dean DD, Boyan BD (2000):**

Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 71, 1258-1269

**Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA (1992):**

Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Methods* 14, 51-57

**Sheen R, MacLeod AM, Mitchell GM, O'Brien BM (1988):**

Reconstruction of mandibular defects with metallic prostheses and microvascular jejunal autografts: an experimental study. *Br J Plast Surg* 41, 138-142

**Shindo M, Fong BP, Funk GF, Karnell LH (2000):**

The fibula osteocutaneous flap in head and neck reconstruction: a critical evaluation of donor site morbidity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126, 1467-1472

**Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG (2001):**

Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581-2593

**Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996):**

Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 17, 237-242

**Smith KE, Huang Z, Ma T, Irani A, Lane Smith R, Goodman SB (2010):**

Molecular profile of osteoprogenitor cells seeded on allograft bone. (*J Tissue Eng Regen Med*, im Druck)

**Sogal A, Tofe AJ (1999):**

Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 70, 1053-1063

**Solchaga LA, Tognana E, Penick K, Baskaran H, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2006):**

A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs. *Tissue Eng* 12, 1851-1863

**Soost F (1998):**

Biocoral--an alternative bone substitute. *Chirurg* 67, 1193-1196

**Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K (2002):**

Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30, 699-704

**Spencer EM, Liu CC, Si EC, Howard GA (1991):**

In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone* 12, 21-26

**Stock UA, Vacanti JP (2001):**

Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 52, 443-451

**Tan W, Vinegoni C, Norman JJ, Desai TA, Boppart SA (2007):**

Imaging cellular responses to mechanical stimuli within three-dimensional tissue constructs. *Microsc Res Tech* 70, 361-371

**Tanck E, Homminga J, van Lenthe GH, Huiskes R (2001):**

Increase in bone volume fraction precedes architectural adaptation in growing bone. *Bone* 28, 650-654

**Temenoff JS, Mikos AG (2000):**

Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 21, 2405-2412

**Triffitt JT (2002):**

Osteogenic stem cells and orthopedic engineering: summary and update. *J Biomed Mater Res* 63, 384-389

**Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle GF, Rochet N (2005):**

Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 26, 5509-5517

**Urist MR (1997):**

Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res* 12, 343-346

**Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001):**

Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med* 344, 1511-1514

**Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE (1998):**

Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 14, 193-202

**Vunjak-Novakovic G, Meinel L, Altman G, Kaplan D (2005):**

Bioreactor cultivation of osteochondral grafts. *Orthod Craniofac Res* 8, 209-218

**Wan M, Shi X, Feng X, Cao X (2001):**

Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 276, 10119-10125

**Wang J, Asou Y, Sekiya I, Sotome S, Orii H, Shinomiya K (2006):**

Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold. *Biomaterials* 27, 2738-2746

**Weiser L, Bhargava M, Attia E, Torzilli PA (1999):**

Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels. *Tissue Eng* 5, 533-544

**Welsch U:**

Lehrbuch der Histologie, 2. Auflage; Urban& Fischer, München 2006

**Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I (2003):**

Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* 84, 205-214

**Westbroek I, Ajubi NE, Alblas MJ, Semeins CM, Klein-Nulend J, Burger EH, Nijweide PJ (2000):**

Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 414-419

**Williams DF:**

Definitions in Biomaterials, 1. Auflage; Elsevier, Amsterdam 1987

**Wippermann BW, Schrott HE, Steeg S, Tscherne H (1997):**

Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases. *Chirurg* 68, 1286-1291

**Wolter JR, Meyer RF (1984):**

Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 82, 187-202

**Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2001):**

The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7, 679-689

**Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002):**

Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174, 11-20

**Zhu H, Schulz J, Schliephake H (2010):**

Human bone marrow stroma stem cell distribution in calcium carbonate scaffolds using two different seeding methods. *Clin Oral Implants Res* 21, 182-188

**Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001):**

Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228

**Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN (2000):**

Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488



## 7. Anhang

### 7.1 Verteilungen der erfassten Fluoreszenzen

#### 7.1.1 DAPI Verteilung

Biocoral plus 2d

	1	2	3	4	5
A	32,35	31,4333333	36,6166667	37,25	44,0166667
B	45,65	17,7666667	14,4	16,5666667	31,8666667
C	41,0333333	20,3666667	16,8	19,35	39,2
D	43,7833333	18,7166667	16,0333333	13,95	31,4333333
E	27,1833333	24,5333333	22,2333333	20,6166667	32,2666667

Biocoral pur 2d

	1	2	3	4	5
A	19,7666667	13,0333333	11,3666667	15	22,3333333
B	15,25	5,3833333	4,2333333	8,0833333	17,05
C	9,9666667	6,6	6,4333333	7,2666667	16,4833333
D	11,05	3,4333333	2,5	7,3166667	11,7
E	9,3833333	6,05	7,1166667	6,1333333	6,0666667

Biocoral plus 1W

	1	2	3	4	5
A	47,3333333	36,5666667	40,4	33,6666667	43,7
B	25,7	11,9166667	10,4333333	14,2833333	34,5
C	27,8166667	12,3666667	7,7833333	12,2333333	27,4666667
D	35,7	10,4166667	6,3	11,1166667	31,7166667
E	69,8	35,5666667	29,6833333	37,5	61,8666667

Biocoral pur 1W

	1	2	3	4	5
A	12,7666667	9,2333333	8,8666667	8,3833333	13,6666667
B	7,1833333	4,2833333	5,2	4,0833333	5,6666667
C	8,25	4,0833333	3,5	2,2833333	5,55
D	8,8333333	3,8666667	3,4	3,0666667	3,5833333
E	8,7333333	6,0166667	6,4666667	9,7166667	7,65

Biocoral plus 2W

	1	2	3	4	5
A	41,15	20,7	19,6	23,5166667	38,7833333
B	21,1666667	9,0833333	7,6333333	11,8333333	32,2833333
C	25,0166667	9,2833333	5,55	11,45	28,45
D	30,4333333	10,35	8,2	10,95	31,9
E	68,5333333	22,6166667	17,7	22,8666667	49,2833333

Biocoral pur 2W

	1	2	3	4	5
A	26,8666667	18,7	20,5	20,4833333	24,5333333
B	28,5333333	12,7166667	11,9	14	24,1833333
C	27,3333333	11,0833333	10,9166667	11,15	22,7666667
D	21,5166667	8,55	8,15	7,9833333	21,8
E	15,7	9,25	8,7166667	12,1333333	28,1166667

Biocoral plus 3W

	1	2	3	4	5
A	30,65	18,7	19,1833333	19,2333333	27,15
B	22,25	10,2666667	8,2	9,7666667	19,6
C	23,9833333	11,3666667	8,8833333	11,3333333	19,35
D	25,0833333	8,8333333	7,25	10,3666667	21,05
E	57,5	31,6166667	30,35	38,6833333	57,4333333

Biocoral pur 3W

	1	2	3	4	5
A	27,4666667	22,0166667	21,5666667	19,0833333	27,45
B	23,1833333	14,7	11,1666667	11,9333333	26,6833333
C	31,0333333	16,6666667	11,6	13,0833333	29,8666667
D	25,9833333	15,1166667	11,2333333	14,2333333	27,35
E	28,8333333	18,45	17,5833333	16,8333333	19,4666667

Tab. 7, Zellverteilung nach 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin

## 7.1.2 Verteilung Osteokalzin

Biocoral plus 2d						Biocoral pur 2d					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	4,75	3,51666667	5,03333333	4,36666667	5,58333333	A	3,6	2,33333333	2,11666667	2,08333333	4,2
B	6,33333333	2,83333333	2,36666667	2,26666667	3,28333333	B	2,4	1,25	1,33333333	1,8	3,8
C	5,58333333	2,9	1,96666667	2,9	5,98333333	C	2,03333333	1,63333333	1,53333333	1,58333333	2,3
D	5,3	3,18333333	2,48333333	2,68333333	6,85	D	2,08333333	0,66666667	0,38333333	0,76666667	1,76666667
E	5,46666667	4,3	4,06666667	3,91666667	4,5	E	2,03333333	1,3	1,23333333	1,38333333	1,8

Biocoral plus 1W						Biocoral pur 1W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	12,58333333	7,03333333	7,31666667	6,78333333	11,61666667	A	5,33333333	3,53333333	3,06666667	3,13333333	6,68333333
B	5,55	2,7	2,45	3,11666667	9,43333333	B	2,73333333	1,95	2,81666667	1,93333333	2,65
C	7,13333333	3	1,81666667	3,48333333	7,06666667	C	3,58333333	1,65	1,5	0,91666667	2,68333333
D	11,2	2,93333333	1,66666667	2,78333333	8,08333333	D	3,8	1,88333333	1,76666667	1,61666667	1,93333333
E	25,21666667	10,45	7,01666667	12,48333333	24,83333333	E	3,93333333	3,66666667	3,46666667	5,48333333	4,28333333

Biocoral plus 2W						Biocoral pur 2W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	24,05	9,51666667	10,66666667	13,53333333	22,23333333	A	12,6	8,51666667	8,33333333	8,16666667	9,46666667
B	11,11666667	4	2,91666667	5,81666667	20,15	B	12,01666667	5,48333333	3,95	6,36666667	10,1
C	15,46666667	5,4	2,73333333	6,45	17,45	C	11,76666667	4,93333333	4,66666667	5,15	10,31666667
D	18,91666667	5,5	4,28333333	5,58333333	19,63333333	D	9,7	3,23333333	3,51666667	4,13333333	11,66666667
E	42,06666667	13,71666667	11,71666667	15,51666667	31,4	E	8	4,46666667	3,46666667	5,16666667	13,31666667

Biocoral plus 3W						Biocoral pur 3W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	13,93333333	8,21666667	8,11666667	7,06666667	10,41666667	A	5,85	4,43333333	5,08333333	5,11666667	7,18333333
B	10,28333333	3,5	3,61666667	3,75	9,6	B	5,3	3,35	3,01666667	3,11666667	7,38333333
C	14,66666667	6,23333333	4,03333333	4,2	9,11666667	C	8,6	3,08333333	3,1	3,5	9,13333333
D	12,86666667	3,3	2,73333333	4,25	9,43333333	D	7,15	3,66666667	2,8	3,3	8,16666667
E	31,36666667	17,88333333	17,68333333	24,31666667	36,33333333	E	8,9	4,46666667	5,5	4,7	5,76666667

Tab. 8, quantitative Expression von Osteokalzin nach 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin

## 7.1.3 Verteilung Osteokalzin in %

Biocoral plus 2d %						Biocoral pur 2d %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	13,6501607	10,9323208	13,5321385	12,21851	15,4731433	A	21,380841	13,1612215	13,3452556	15,8959084	19,5153909
B	13,2086917	12,2738115	11,4601434	11,2552352	12,0639557	B	15,9269817	18,2545315	22,4373638	19,1462027	18,4097972
C	15,2897244	14,1871138	10,6924837	16,0552088	16,7678705	C	22,0335284	22,3622558	12,8550885	19,758333	15,3297869
D	13,2918485	19,2449187	20,3074973	19,2507266	22,8998698	D	11,4261272	9,71526037	2,74547804	7,12421433	10,1376274
E	20,712479	19,783413	22,3240267	21,06437	14,5012694	E	13,240084	15,1050455	15,6874179	13,2495256	18,2786979

Biocoral plus 1W %						Biocoral pur 1W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	30,5722416	22,3943902	25,9335047	26,7359908	30,1409934	A	43,4321768	42,3112642	32,6814656	36,476394	51,1490839
B	25,3248837	39,5383251	40,0677721	31,475821	37,67298	B	42,5811333	40,1824004	59,8674242	31,8307342	40,768722
C	30,7564332	35,209923	35,7867495	34,0781884	34,1925932	C	46,0352751	41,8278902	43,6688312	39,7985348	48,1320126
D	32,2243464	29,185603	33,9937259	28,7840031	37,1615739	D	41,3517025	47,8774349	55,1190476	53,0555556	50,6365741
E	39,5683548	39,707907	32,4386138	35,1520747	38,7712123	E	52,8609685	52,848569	54,313195	57,6342951	59,2936687

Biocoral plus 2W %						Biocoral pur 2W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	54,0924599	47,9006035	53,1085624	55,7802107	57,9912935	A	44,2830914	42,4908156	38,2998218	36,9999126	34,526069
B	52,6913288	43,6445675	37,2803695	53,5150627	62,5456736	B	40,0791716	42,8192078	31,2749433	44,0871262	43,528548
C	59,4977249	54,8746228	44,8958333	53,8487878	60,9246122	C	39,6700277	55,5339532	44,1535915	50,4137615	47,8522637
D	60,8000571	55,8129487	56,0171743	49,2135555	60,5814998	D	44,8455854	32,1464939	55,6003868	68,1734339	53,9748307
E	61,9502169	56,4201559	62,1820575	65,324706	63,2181675	E	51,9066416	55,5327185	37,9896774	40,2858369	43,2079818

Biocoral plus 3W %						Biocoral pur 3W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	44,1009107	40,8139011	39,3668841	31,9404614	37,2418764	A	21,9240567	21,6480887	24,5147213	26,4510962	26,1613376
B	45,8774132	33,3098556	41,0104317	40,4877434	49,1083688	B	24,0296462	25,4128304	30,4039678	28,5810246	28,8468557
C	57,7550548	51,6586896	47,6082809	41,2322052	45,6797631	C	31,5536835	22,5736587	27,542229	28,8265855	32,6450488
D	50,6478226	32,5790442	36,5157158	37,7857361	44,6091552	D	30,9458846	27,0733172	27,7625679	26,0838068	31,7769116
E	53,9112101	59,6849341	57,821395	60,3667756	52,2905944	E	34,9402391	25,95157	34,7818346	31,0333068	34,2041053

Tab. 9, prozentuale Expression von Osteokalzin nach 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin

## 7.1.4 Verteilung VEGF

Biocoral plus 2d						Biocoral pur 2d					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	3,6	2,6666667	3,85	4,3833333	5,0833333	A	2,4166667	1,7666667	2	1,85	3,9666667
B	4,4166667	2,2833333	2,2833333	2,15	3,7	B	2,4166667	1,1166667	1,2166667	1,5	3,3333333
C	3,7833333	3,1	2,4333333	2,8	4,8	C	1,6	1,6833333	1,6666667	1,4666667	3,25
D	4,6166667	3,6166667	2,9666667	2,5833333	5,55	D	2,3166667	0,6	0,1333333	0,85	1,35
E	4,95	4,3333333	3,7	2,9166667	3,1833333	E	1,8166667	1,2833333	1,25	1,3	1,5166667

Biocoral plus 1W						Biocoral pur 1W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	11,9	6,0833333	6,2333333	6,3166667	11,4166667	A	5,1833333	3,8166667	3,2333333	3,6666667	6,6
B	4,7333333	1,8	2,1333333	2,9833333	8,2833333	B	3,0166667	1,85	2,3666667	1,9166667	2,6166667
C	6,7666667	2,5666667	1,4666667	2,85	6,05	C	3,7166667	1,6666667	1,5666667	0,7666667	2,55
D	9,75	2,9166667	1,5166667	2,7666667	7,55	D	3,6833333	1,9	1,6166667	1,5166667	1,7666667
E	24,883333	8,9833333	5,3666667	12,433333	21,883333	E	3,2333333	3,2	2,9333333	4,9166667	3,7166667

Biocoral plus 2W						Biocoral pur 2W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	22,283333	9,55	9,2833333	12,3	20,4	A	11,9	8,4333333	7,1333333	7,6833333	8,6333333
B	9,4	3,7166667	2,6833333	5,5	18,5	B	11,733333	5,35	3,5333333	5,6833333	9,3333333
C	14,933333	4,9333333	2,5166667	6,2	16,55	C	10,233333	3,9	3,9333333	5,1333333	9,8
D	18,3	5,3333333	3,5166667	5,3333333	17,666667	D	8,75	2,9666667	3,2166667	3,6166667	10,233333
E	41,416667	12,9	10,25	14,166667	28,233333	E	8,2666667	4,6333333	3,3666667	4,85	12,233333

Biocoral plus 3W						Biocoral pur 3W					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	12,45	7,5666667	6,9	7,0333333	8,6833333	A	4,25	3,7333333	3,75	3,15	5,8666667
B	9,6	2,9333333	2,9333333	3,4	8,2833333	B	4,75	2,5666667	1,9166667	2,4166667	5,5
C	13,966667	5,5166667	3,2333333	4,1833333	8,8333333	C	6,3	2,3833333	2,3166667	2,6833333	6,4166667
D	11,583333	3,3	2,5666667	4,05	8,45	D	5,7833333	2,6333333	1,9166667	2,8333333	6,05
E	31,516667	16,583333	14,533333	22,466667	34,95	E	6,6166667	3,5	3,8666667	3,4	3,95

Tab. 10, quantitative Expression von VEGF nach 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin

7.1.5 Verteilung VEGF in %

Biocoral plus 2d %						Biocoral pur 2d %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	11,8862966	9,94169543	10,3314295	12,1710736	12,357766	A	13,7185202	8,89474443	11,3745902	13,0111922	18,9366693
B	9,12674866	11,5009094	10,1440643	10,708747	11,8632892	B	15,9077465	17,154215	20,6508715	14,9429363	19,2963847
C	12,6594989	14,6987932	12,0528483	14,7281176	13,4405215	C	17,6439589	23,0598799	13,2744496	18,5820224	20,2250812
D	12,3955147	17,2287857	20,9409781	18,4730883	19,1686304	D	10,8667289	9,22445001	1,77648579	6,54114704	7,9976037
E	18,245199	19,8240779	18,8665923	15,0353796	13,4453434	E	11,8287247	14,1277394	14,5183036	12,9585271	17,7045916

Biocoral plus 1W %						Biocoral pur 1W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	29,6952365	22,9092379	28,9293083	29,9528259	28,8483544	A	43,1683989	46,4753924	34,2576579	42,8609583	49,1914111
B	20,6037597	25,7555494	37,5112899	30,6169417	33,1990344	B	42,5745413	37,5559733	50,6460433	31,1890833	50,3052503
C	27,6359947	28,0641812	33,1763285	28,6179377	27,6391757	C	47,1050655	43,4872889	47,5844757	36,3797314	41,1875683
D	28,9837733	27,0765532	29,5297977	33,035023	29,8599811	D	39,512817	48,8299713	50,8333333	51,1111111	48,3796296
E	37,2361873	33,8892996	25,6818143	33,1332331	34,4079609	E	41,8563522	47,4671993	45,9135119	61,0973229	53,5439603

Biocoral plus 2W %						Biocoral pur 2W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	50,2090062	48,0540341	48,092462	52,0884609	53,0956385	A	41,999997	40,375025	31,582743	35,1108461	32,3690909
B	44,6432406	39,3593594	34,2610314	47,6598667	57,4695689	B	39,7290666	41,4776956	26,4003123	39,3798124	40,7379441
C	57,9031817	50,5099789	42,7612434	50,505744	57,1093896	C	35,3657097	45,4050026	38,9321544	49,8817863	45,9372402
D	56,0837313	54,1131433	42,248966	46,9849919	55,0271801	D	40,3158293	28,0975554	50,7700422	63,2801079	46,5210493
E	60,9026312	49,981217	52,7380313	59,2131931	57,192249	E	51,9747794	55,1974153	34,7337313	39,3391872	39,7034311

Biocoral plus 3W %						Biocoral pur 3W %					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
A	39,8910984	38,4035939	33,5886023	31,6799996	29,7909534	A	17,1995156	19,3846029	19,073758	15,4889062	21,0993474
B	40,5643947	26,8159851	32,4130592	36,8674453	41,6988081	B	21,9783881	18,4846643	18,7515343	21,7642253	22,0095004
C	55,5471986	44,7821869	36,4258597	37,0850523	43,4439032	C	23,5194966	18,8344003	20,2463241	22,7229924	23,8953222
D	42,1926497	30,330034	30,5414971	34,6088039	40,0668853	D	25,8288707	21,4638993	20,5802111	23,862439	24,6025874
E	52,6388912	54,3831793	47,2185069	53,3782523	49,2288992	E	26,860796	20,4551333	24,6545964	21,6328363	23,855702

Tab. 11, prozentuale Expression von VEGF nach 2d, 1W, 2W, 3W jeweils mit und ohne Fibrin

## 7.2 Vergleich Zentrum gegen Peripherie

### 7.2.1 Regionale Verteilung der Zellkernerfassung

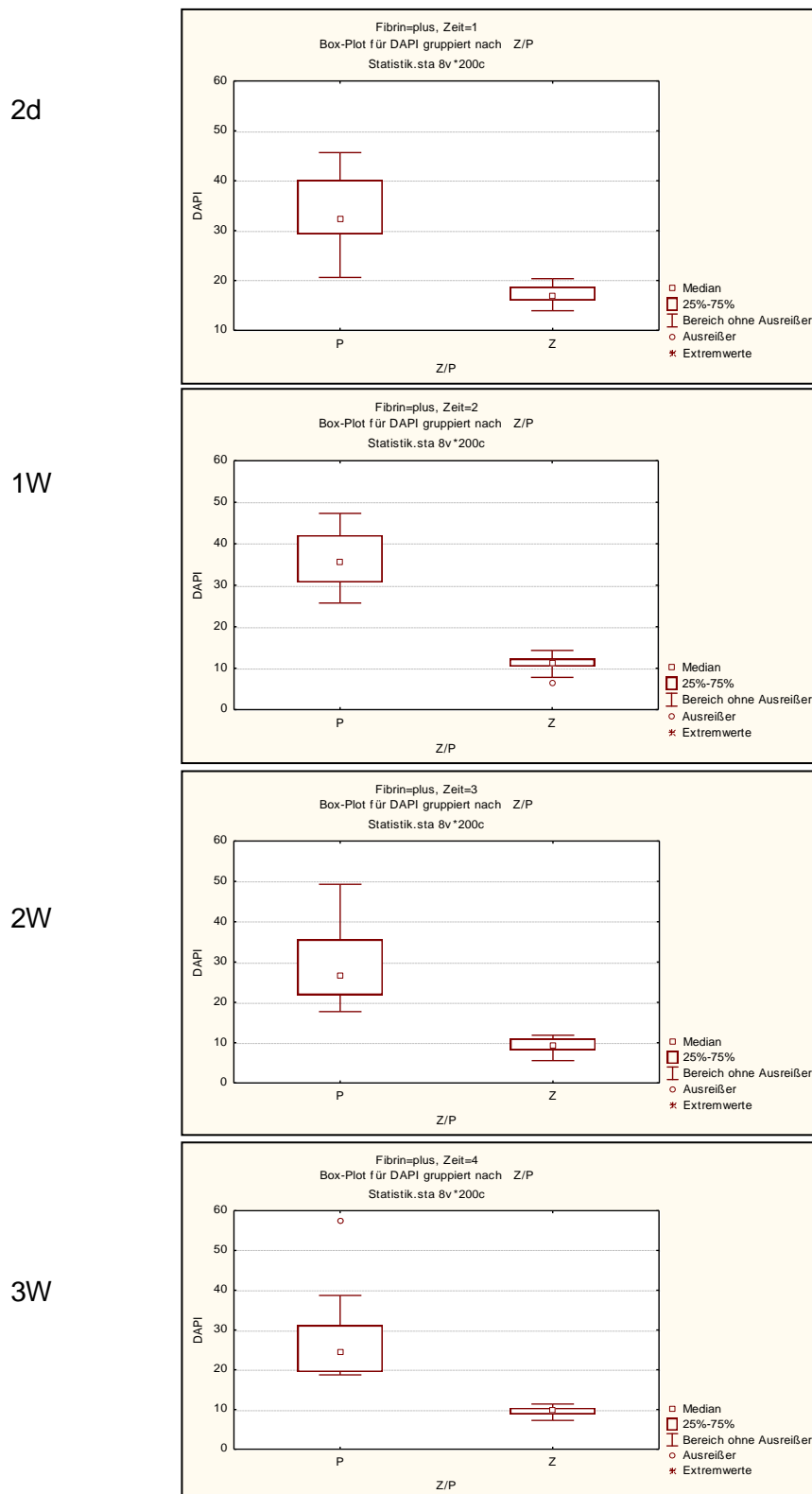


Abb. 36, Regionale Verteilung der Zellkernerfassung mit Fibrinmatrix zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W; Zentrum gegen Peripherie

## 7.2.2 Regionale Verteilung der Expression von Osteokalzin

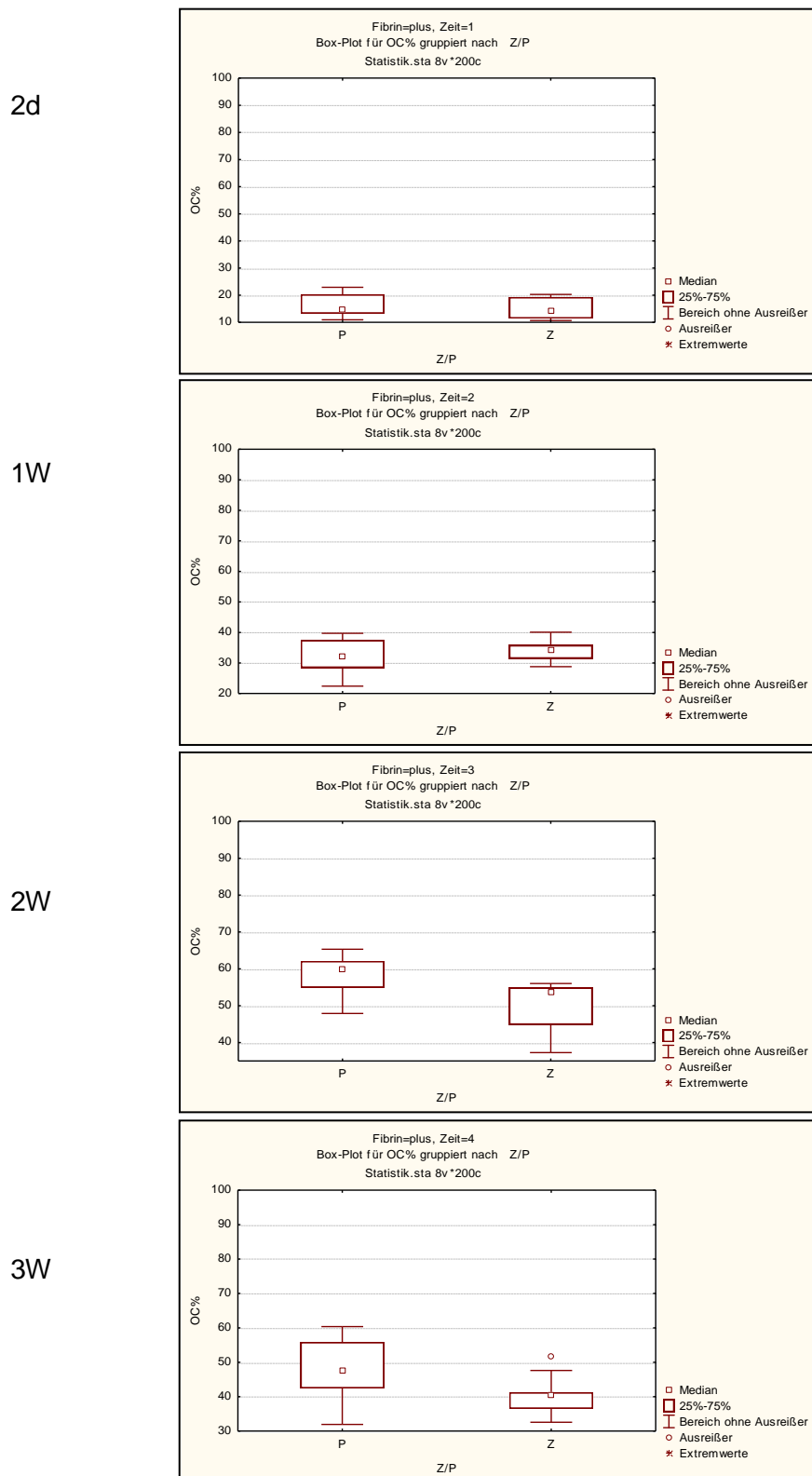


Abb. 37, Regionale Verteilung der Expression von Osteokalzin in Prozent der Zellzahl mit Fibrinmatrix zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W, Zentrum gegen Peripherie

## 7.2.3 Regionale Verteilung der Expression von VEGF

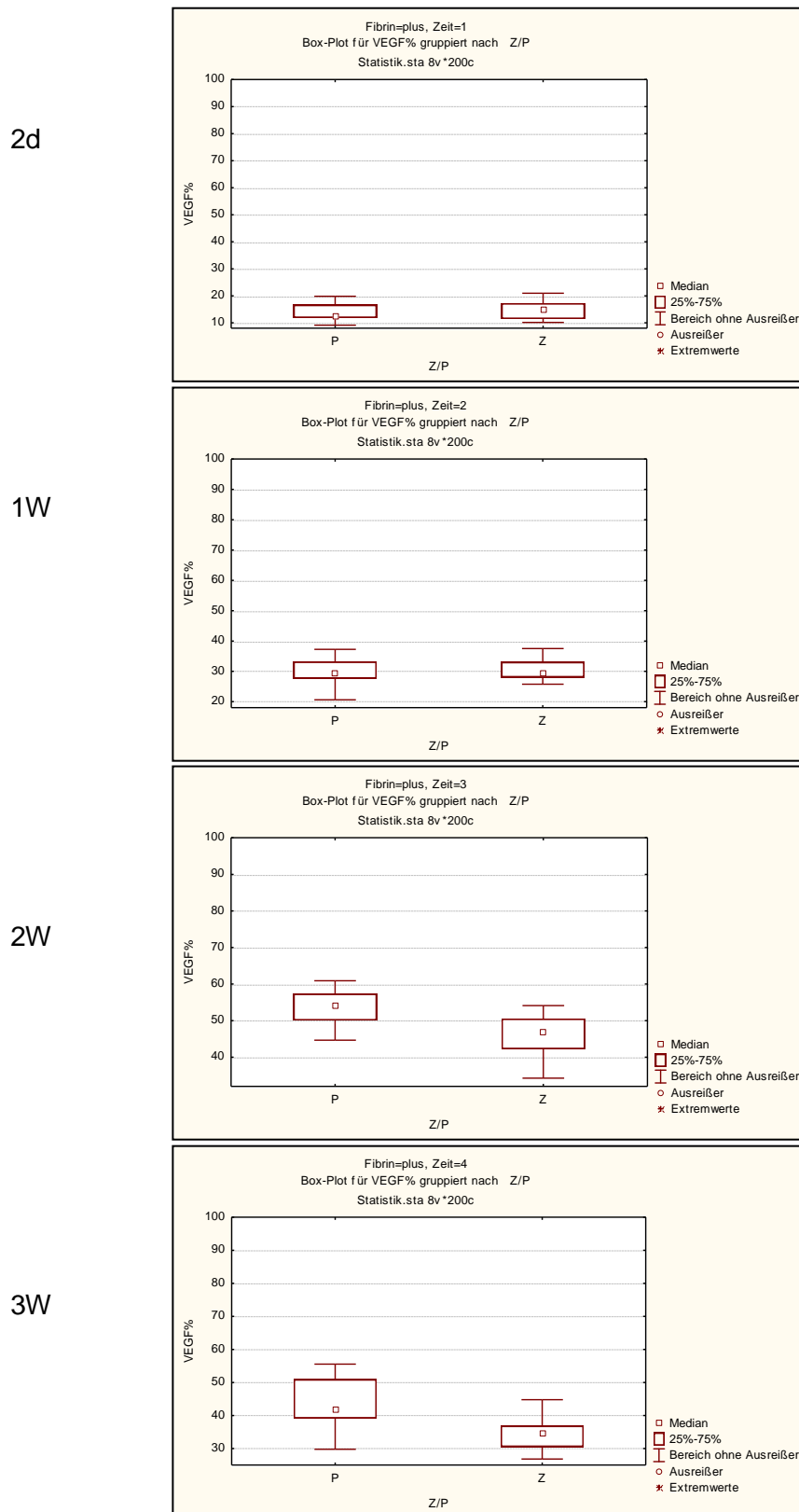


Abb. 38, Regionale Verteilung der Expression von VEGF in Prozent der Zellzahl mit Fibrinmatrix zu den Zeitpunkten 2d, 1W, 2W, 3W, Zentrum gegen Peripherie



**Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas, die wertvollen Anregungen bei der Vorbereitung und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern, vor allem Frau Jutta Schulz, durch deren Hilfe so manche Hürde der Laborarbeit genommen werden konnte.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. R. Gruber und Herrn Dr. rer. nat. H.J. Rolf, die mir wissenschaftlich mit Rat und Tat jederzeit zur Seite gestanden haben.

**Nils Lohse**

Ich wurde am 11. Dezember 1983 in München als Sohn von Melody Ann geb. McLaughlin und Dr. med. Jürgen Lohse geboren. Von 1990 bis 1994 besuchte ich die Grundschule Steenkamp in Travemünde. Die allgemeine Hochschulreife erlangte ich 2003 am Johanneum zu Lübeck. Nach dem Zivildienst von September 2003 bis Juni 2004 in der Sana-Klinik Lübeck und Ableistung des Krankenpflegepraktikums begann ich zum Wintersemester 2004/2005 das Studium der Humanmedizin an der Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden. Nach Absolvierung des Physikums wechselte ich zum Wintersemester 2006/2007 an die Georg-August-Universität Göttingen. Famulaturen leistete ich in den Fächern Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie ab. Das Praktische Jahr verbrachte ich in den Tertialen Innere Medizin und Chirurgie im evangelischen Krankenhaus Göttingen/Weende und im Wahltertial in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Göttingen. Das Medizinstudium beendete ich mit dem Staatsexamen 2010. Zum Wintersemester 2010/2011 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen.