

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

Knochenregeneration in vivo durch kombinierte
Freisetzung von BMP und VEGF aus
PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds

INAUGURAL- DISSERTATION

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

vorgelegt von

Dr. med. Nils Lohse

aus
München

Göttingen 2015

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.- J. Kramer
II. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. med. dent. N. Gersdorff
III. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. med.dent. R. Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	22.02.2016

1. Einleitung	7
1.1 Aufbau von Knochengewebe.....	7
1.2 Knochenbildung.....	8
1.3 Knochenwachstum	8
1.4 Knochenersatzmaterialien.....	9
1.4.1 Autogener Knochenersatz.....	10
1.4.2 Allogener Knochenersatz.....	11
1.4.3 Alloplastischer Knochenersatz.....	12
1.4.4 Xenogener Knochenersatz.....	13
1.5 Wachstumsfaktoren.....	14
1.6 Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Trägermaterialien.....	16
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Geräte und Laborausstattung.....	18
2.2 Reagenzien und Lösungen.....	19
2.3 Herstellung der Implantate.....	21
2.4 Charakterisierung der Versuchstiere und Tierhaltungsbedingungen.....	22
2.5 Gruppeneinteilung und Gruppengröße.....	22

2.6	Operation.....	23
2.7	Postoperative Tierhaltung.....	24
2.8	Versuchsabschluss.....	25
2.9	Histologische Bearbeitung.....	25
2.9.1	Einbettung in Technovit und Herstellung der Hartschnittpräparate.....	25
2.9.2	Herstellung der Trenndünnschliff-Präparate.....	26
2.10	Alizarinrot- Methyleneblau- Färbung nach Smith- Karagianes	27
2.11	Mikroskopische Untersuchung.....	27
2.12	Histomorphometrische Auswertung.....	28
2.13	Statistik.....	28
3.	Ergebnisse.....	29
3.1	Histomorphometrische Analyse.....	29
3.2	Vergleich der Einzeldosierungen von BMP.....	30
3.3	Vergleich der Einzeldosierungen von VEGF.....	32
3.4	Vergleich der Kombinationsdosierungen von BMP und VEGF.....	32
3.5	Vergleich der Kombinationen von BMP und VEGF mit den Einzeldosierungen von BMP in der Applikationsgruppe <i>slow release</i>	35

4.	Diskussion	37
4.1	Diskussion der Methode.....	38
4.1.1	Tiermodell.....	38
4.1.2	Wachstumsfaktoren.....	39
4.1.3	Herstellung und Beladung der Implantate mit Wachstumsfaktoren.....	40
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	42
4.2.1	Vergleich der Einzeldosierungen.....	42
4.2.2	Vergleich der Kombinationsdosierungen.....	43
4.2.3	Vergleich der Kombinationsdosierungen mit den Einzeldosierungen..	44
4.3	Ausblick.....	45
5.	Zusammenfassung	46
6.	Literaturverzeichnis	47
7.	Anhang	55
7.1	Statistische Analyse nach 4 Wochen, Applikation: <i>slow release</i>	55
7.2	Statistische Analyse nach 12 Wochen, Applikation: <i>slow release</i>	58
7.3	Statistische Analyse nach 26 Wochen, Applikation: <i>slow release</i>	61

7.4	Statistische Analyse alle Zeitpunkte gemittelt, Applikation: <i>slow release</i>	64
7.5	Statistische Analyse nach 4 Wochen, Applikation: <i>slow release</i> und lokal.....	67
7.6	Statistische Analyse nach 12 Wochen, Applikation: <i>slow release</i> und lokal.....	70
7.7	Statistische Analyse nach 26 Wochen, Applikation: <i>slow release</i> und lokal.....	73
7.8	Statistische Analyse alle Zeitpunkte gemittelt, Applikation <i>slow release</i> und lokal.....	76

1. Einleitung

1.1 Aufbau von Knochengewebe

Das Knochengewebe ist wesentlicher Bestandteil des Bewegungsapparates und erfüllt metabolische Funktionen im Körper. Es dient als Speicher für Kalzium, Magnesium, Phosphor und Natrium (Welsch 2006). Als spezialisiertes Bindegewebe besteht es überwiegend aus einer extrazellulären kalziumreichen Knochenmatrix und darin eingebetteten Knochenzellen.

Chemisch ist die Extrazellulärsubstanz zu 45% aus Mineralien, zu 30% aus organischem Material und zu 25% aus Wasser zusammengesetzt. Die reife mineralisierte extrazelluläre Matrix besteht überwiegend aus Hydroxylapatit- Kristallen und kollagenem Bindegewebe, welches in unreifem Knochen geflechtartig (Geflechtknochen) und im reifen Knochen schichtartig (Lamellenknochen) konfiguriert ist. Makroskopisch teilt man Knochengewebe in Spongiosa und Kompakta ein, wobei beide Anteile aus Lamellenknochen bestehen (Lüllman-Rauch 2006). Die Anordnung der Lamellen des Knochengewebes erfolgt mehrheitlich konzentrisch um Blutgefäße herum und bildet einen zylindrischen Baustein, die Osteone oder Havers- Systeme genannt werden. Die Trabekel der Spongiosa weisen unregelmäßig ausgerichtete Lamellen ohne zentrale Gefäßkonfiguration auf (Welsch 2006).

Im Knochen werden verschiedene Zellen unterschieden. Spezifische Zellen sind Osteoblasten, die das Knochengewebe bilden, Osteozyten, die eingemauert in der extrazellulären Matrix den Knochenstoffwechsel unterhalten und Osteoklasten, die für Umbauprozesse am Knochengewebe verantwortlich sind.

Osteoblasten produzieren die organischen Bestandteile der Knochenmatrix und befinden sich an der Oberfläche von Geflechtknochen. Sie synthetisieren Matrixproteine und setzen diese in die Umgebung frei, wobei eine noch nicht kalzifizierte Matrixschicht entsteht, die man Osteoid nennt.

Osteozyten sind in Lakunen des verkalkten Knochens eingemauert und stehen über Fortsätze untereinander in Verbindung, um den Stoffaustausch zwischen den Zellen zu ermöglichen.

Osteoklasten sind in der Lage, mineralisierten Knochen zu resorbieren und gehören dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) an.

Umgeben ist Knochengewebe innen und außen von einer bindegewebigen Hülle, dem Endost bzw. Periost (Junqueira 2005).

Somit ist Knochen ein formgebendes und formstabilisierendes Gewebe mit einem ausgeprägten Hohlraumanteil, dessen Architektur je nach Anforderung variieren kann und an die jeweiligen Bedürfnisse von Belastung und Metabolismus angepasst wird (Speckmann 2008).

1.2 Knochenbildung

Die Neubildung von Knochen kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen, die desmale Ossifikation und die chondrale Ossifikation.

Die desmale Ossifikation oder auch direkte Knochenbildung beschreibt die Entstehung von Knochengewebe direkt aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die zu Knochenzellen differenzieren und zunächst Osteoid sezernieren. Anschließend kommt es zur Ausfällung von Kalziumphosphat und somit zur Verkalkung der Matrix, sodass Geflechtknochen entsteht. Später erfolgt durch Umbauprozesse die Umformung zu Lamellenknochen (Welsch 2006).

Die chondrale Ossifikation beschreibt die Knochenbildung über ein knorpeliges Gerüst hin zum ausgereiften Knochengewebe. Diese Form der Knochenbildung wird auch als indirekte Knochenbildung bezeichnet, da das Knorpelgerüst zunächst abgebaut und anschließend durch Knochengewebe ersetzt wird. Die chondrale Ossifikation wird eingeteilt in die perichondrale Ossifikation, bei der eine Knochenmanschette um einen knorpeligen Schaft herum gebildet wird, und in die enchondrale Ossifikation, bei der das Knorpelskelett abgebaut und durch einen sich ausdehnenden Knochenkern ersetzt wird (Welsch 2006).

1.3 Knochenwachstum

Das Längenwachstum von Knochengewebe erfolgt durch die synchrone Proliferation von Knorpelzellen und den Abbau von Knorpelgewebe mit anschließendem Ersatz durch Knochengewebe im Bereich der Epiphysenfuge. Dieses Wachstum hält solange an, bis sich die Knorpelzellen nicht mehr teilen und die Epiphysenfuge verknöchert.

Knochen kann während und nach Abschluss des Längenwachstums in der Breite und im Durchmesser wachsen. Osteoblasten im Periost sind in der Lage, Knochen zu bilden und können so die Kortikalis des Knochens verstärken und den Durchmesser des Knochens vergrößern (Lüllman-Rauch 2006).

Die Regulation des Knochenwachstums wird durch eine Vielzahl von Wirkstoffen und Hormonen gesteuert, die bis heute noch nicht abschließend erklärt werden können.

Darüber hinaus haben Faktoren wie die Muskelaktivität, die Beanspruchung oder das Körpergewicht einen Einfluss auf das Breitenwachstum des Knochens (Junqueira 2005).

1.4 Knochenersatzmaterialien

Traumata, Infektionen und angeborene Fehlbildungen können Knochendefekte hervorrufen. Wenn es sich um ausgedehnte Knochendefekte handelt, können diese nicht mehr durch die physiologische Regenerationskraft des Körpers alleine ausheilen (Burg et al. 2000). Diese Knochensubstanzdefekte, die eine kritische Größe überschreiten, werden als *Critical Size Defect* bezeichnet und als die kleinste intraossäre Wunde eines speziellen Knochens und einer speziellen Spezies definiert, die nicht mehr spontan während der Lebenszeit des Individuums abheilen kann (Schmitz und Hollinger 1986).

Die Nachfrage nach Therapieansätzen zur Regeneration von Knochendefekten beschäftigt Ärzte schon seit vielen Jahren (De Boer 1988). So wurde das erste Knochentransplantat 1668 durch den holländischen Chirurgen Job van Meekeren beschrieben, der einen traumatischen Schädeldefekt eines Soldaten erfolgreich mit einem Transplantat eines Hundeschädels versorgte (Van Meekeren 1668). 1674 wurden durch die Erschließung der histologischen Strukturen des Knochengewebes durch den niederländischen Naturforscher Antoni von Leeuwenhoek die grundlegenden Kenntnisse für die Weiterentwicklung der Knochentransplantationschirurgie geschaffen (Van Leeuwenhoek 1674). Der französische Forscher Ollier konnte in seinen Versuchen mit Kaninchen und jungen Hunden erstmals zeigen, dass Knochenanteile auch ohne periostale Versorgung in einem geeigneten Milieu überleben können (Ollier 1867). Die ersten autologen Knochentransplantationen wurden von dem deutschen Forscher Philip von Walter 1820 durchgeführt, indem er den im Rahmen einer Trepanation entnommenen Knochen zur Wiedereinheilung brachte (Walter 1821). Die ersten allogenen Knochentransplantationen wurden durch den schottischen Forscher William Macewen 1880 durchgeführt, der den infizierten Oberarmknochen eines 4 Jahre alten Jungen durch den Schienbeinknochen eines anderen Jungen mit Rachitis ersetzte (Macewen 1881). Die Theorie der Osteoinduktion, wonach Mediatoren durch Einflussnahme auf Zellen die Knochenneubildung steigern, wurde bereits 1967 durch eine Forschergruppe um Urist beschrieben (Urist et al. 1967).

So konnten im Laufe der letzten Jahre definierte Eigenschaften als Grundlage für die erfolgreiche Regeneration von Knochengewebe beschrieben werden. Knochenersatz sollte osteoinduktiv wirksam sein und die Differenzierung von unreifen Zellen zu Knochenzellen verstärken. Außerdem sollte der Knochenersatz osteokonduktiv sein und den Knochenzellen als Leitschienen für das Gewebewachstum dienen. Zusätzlich sollte das Konstrukt für den Knochenersatz osteogenes Potential besitzen und Zellen der osteogenen Entwicklungsreihe aufweisen.

Abgesehen von diesen grundlegenden Eigenschaften eines wünschenswerten Knochenersatzmaterials gibt es weitere Faktoren, die die Erfolgswahrscheinlichkeit der Knochenregeneration durch die Verwendung von Knochenersatzmaterialien verbessert können (Oestern und Probst 1997):

- Keine immunologischen Abstoßungsreaktionen
- Frei von toxischen oder mutagenen Nebenwirkungen
- Sterilität
- Vollständiger knöcherner Ein- und Umbau
- Hohe biologische Eigenpotenz
- Festigkeit entsprechend den jeweiligen Erfordernissen
- Keine Mengen- und Lagerungsprobleme
- Freie Auswahl in Form und Größe
- Einfache Bearbeitbarkeit
- Niedrige Kosten

1.4.1 Autogener Knochenersatz

Autogener Knochenersatz beschreibt die Transplantation von lebendem Gewebe innerhalb eines Individuums. Der autogene Knochenersatz stellt nach wie vor den Goldstandard in der Versorgung von Knochendefekten dar. Ursächlich hierfür ist, dass autogener Knochen nicht nur eine geringe immunologische Potenz aufweist und sehr gewebeverträglich ist, sondern auch die günstigsten osteogenen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften besitzt (Samartzis et al. 2005).

So enthält dieser Knochenersatz eine Vielzahl von osteogenen Zellen und osteoinduktiven Proteinen und bietet durch seine physiologische extrazelluläre Matrix eine geeignete Leitschiene für das weitere Knochenwachstum (Bauer und Muschler 2000).

Unterschieden werden Spongiosatransplantate und Kortikalistransplantate, die jeweils vaskularisiert (Hidalgo 1991) und nicht vaskularisiert verpflanzt werden können (Jewer et al. 1989), wobei spongiöser Knochen im Vergleich zu kortikalem Knochen bessere osteogene Eigenschaften besitzt, jedoch schlechtere strukturelle Stabilität bietet (Torrioni 2009, Gazdag et al. 1995).

Beim Patienten eignen sich für die Entnahme von Spongiosatransplantaten der Beckenkamm, die distale Speiche, das laterale Tuberkel des Schienbeins und der distale Teil des Schienbeins. Zur Gewinnung von kortikalen Transplantaten werden hauptsächlich das Wadenbein, Teile der verknöcherten Rippen und der Beckenkamm verwendet (Finkemeier 2002). Zusätzlich wird im klinischen Alltag in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Knochenmaterial verwendet, das von intraoral im Bereich des Oberkiefers, des Kieferwinkels oder des Kinns entnommen wird (Yates et al. 2013).

Den Vorteilen des autogenen Knochens stehen jedoch auch Nachteile gegenüber:

So kommt es zu einer zusätzlichen Belastung der Patienten durch eine Verlängerung von Operationszeit und Narkosedauer, erhöhte Komplikationsraten können durch Infektionen, Blutverluste, Schmerzen, und Hämatombildung im Bereich der Entnahmestelle entstehen, und besonders bei der Versorgung von größeren knöchernen Defekten ergeben sich Limitationen durch eine begrenzte Verfügbarkeit von autogenem Knochengewebe (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, Pitzen et al. 2004).

1.4.2 Allogener Knochenersatz

Allogener Knochenersatz bezeichnet die Transplantation von Leichenknochen. Diese Transplantate verfügen neben einer geringen osteoinduktiven Wirkung hauptsächlich über osteokonduktive Eigenschaften, jedoch ohne das Vorhandensein von osteogenetisch wirksamen Zellen (Habibovic und de Groot 2007). Durch Resorptionsvorgänge des Transplantates und gleichzeitiger Knochenneubildung kommt es zum schleichenden Ersatz (*creeping substitution*) des Transplantates (Oestern und Probst 1997).

Ein Vorteil des allogenen Knochenersatzes ist die ausreichende Verfügbarkeit ohne die Gefahr einer Komplikation für die Entnahmestelle des Spenders.

Die Gefahr der Übertragung von Infektionen von dem Spender auf den Empfänger wird jedoch weiterhin kontrovers in der Literatur diskutiert (Nandi et al. 2010).

Zur Reduktion der Infektiosität werden allogene Knochentransplantate unterschiedlichen Aufbereitungsprozeduren unterzogen, wie z.B. ionisierende Bestrahlung, chemische oder thermische Sterilisation oder Kryokonservierung (Oestern und Probst 1997, Bauer und Muschler 2000). Dadurch wird ein avitales Knochentransplantat geschaffen, was den Erfolg des Gewebeersatzes gefährden kann (Eppley et al. 2005). Darüber hinaus sind weitere Komplikationen durch die Verwendung von allogem Knochenersatzmaterial in der Literatur beschrieben, wie z.B. frühe Resorptionsvorgänge durch Osteoklasten oder eine erhöhte Prävalenz für Mikrofrakturen als Folge einer herabgesetzten Stabilität (Schmidt- Rohlfig et al. 2009).

Allogener Knochenersatz ist in verschiedenen Formen verfügbar: So werden demineralisierte Knochenmatrizes (DBM), Spongiosaspäne, Spongiosa- und Kortikalistransplantate, osteochondrale Transplantate und ganze Knochensegmente beschrieben und seit Jahren im klinischen Alltag eingesetzt (Oestern und Probst 1997, Bauer und Muschler 2000).

1.4.3 Alloplastischer Knochenersatz

Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind körperfremd, synthetischen oder biologischen Ursprungs. Sie lassen sich in kalziumphosphatbasierte keramische Materialien wie Hydroxylapatit (HA) und β - Trikalziumphosphat (β -TCP), bioaktive Gläser und polyesterbasierte Knochenersatzmaterialien unterteilen (Nandi et al. 2010).

Hydroxylapatit ist eine biokompatible Keramik, die durch Erhitzen in hochkristalliner Form des Kalziumphosphats vorliegt. Aufgrund seiner chemische Ähnlichkeit zu mineralisiertem Knochengewebe weist Hydroxylapatit osteokonduktive und biokompatible Eigenschaften auf (Ghosh et al. 2008). Außerdem konnte in Studien gezeigt werden, dass Hydroxylapatite sich als Träger für osteoinduktiv wirksame Proteine eignet (Noshi et al. 2000). Gegen die Verwendung von Hydroxylapatit als Knochenersatzmaterial spricht seine Löslichkeit im Körper und seine ungünstigen mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu natürlichem Knochengewebe (Santos et al. 2007).

Trikalziumphosphat ist ähnlich wie Hydroxylapatit biokompatibel und von der chemischen Zusammensetzung dem natürlichen Knochen sehr ähnlich, jedoch erfolgt die biologische Degredation umfangreicher als die von Hydroxylapatit (Daculsi et al. 1990). Seine physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften haben es in der Vergangenheit zu einem häufig verwendeten Knochenfüller im klinischen Alltag gemacht (Nandi et al. 2010). Bioaktive Gläser sind ebenfalls biokompatibel und osteokonduktiv und bestehen aus Kieselsäure, Natriumoxid, Kalziumoxid und Phosphat. Bioaktive Gläser sind in der Lage, eine Doppelschicht von Siliziumgel und Kalziumphosphat auszubilden, wenn sie mit Blut in Kontakt geraten. Kollagen und andere Proteine des Knochens werden gebunden und bewirken einen direkten chemischen Verbund (Hench und Wilson 1984). Bioaktive Gläser wurden in der letzten Zeit besonders bei der Rekonstruktion von Knochendefekten des Gesichtsschädels, für die Therapie von parodontalen Läsionen, für die Behandlung von Orbitabodendefekten und für die Rekonstruktion von Entnahmestellen nach Beckenkammosteoplastik verwendet (Nandi et al. 2010).

Zu den polyesterbasierte Knochenersatzmaterialien zählen Polyglykoxide (PGA), Polylaktide (PLA) und Polycaprolaktone (PCL) (Filion und Song 2011). Polylaktide (PLA) sind aus Milchsäure hergestellte Polymere und können in amorpher Form mit geringer Festigkeit und kristalliner Form mit hoher Festigkeit vorliegen (Bendix und Liedtke 2006).

Die Degradationsdauer von polymerbasierten Knochenersatzmaterialien beträgt für amorphe Polylaktide 12 bis 16 Monate und kann bei kristallinen Polylaktiden zwischen drei bis fünf Jahren liegen (Middleton und Tipton 2000). Der Vorteil von abbaubaren Polymeren ist, dass der Körper das Ersatzmaterial vollständig resorbieren kann und es somit zur rückstandslosen Heilung des Körpers kommen kann. Die beim Abbau des Materials frei werdende Milchsäure, die einer Knochenneubildung durch Auslösung einer lokalen Entzündungsreaktion entgegenwirken würde, kann durch Zugabe von Kalziumphosphat neutralisiert werden (Schiller et al. 2004).

1.4.4 Xenogener Knochenersatz

Xenogene Knochenersatzmaterialien sind Gewebestrukturen einer anderen Spezies und können bovinen, equinen, porcinen oder corallinen Ursprungs sein.

Durch Deproteinisierungsvorgänge der Hydroxylapatitstruktur des xenogenen Gewebes wird die Gefahr der Erregerübertragungen als sehr gering eingeschätzt (Oestern und Probst 1997).

In tierexperimentellen Studien konnte eine vollständige knöcherne Durchbauung der Ersatzmaterialien nachgewiesen werden, wobei bedingt durch die veränderte Struktur des Materials kein Abbau erfolgt, sondern das Ersatzmaterial verbleibt unverändert am Ort der Implantation (Oestern und Probst 1997).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das Gebiet der Knochenersatzmaterialien in den letzten Jahren zwar umfangreich untersucht wurde, jedoch erfüllt keines der aktuell in der klinischen Anwendung befindlichen Knochenersatzmaterialien alle vorgegebenen Eigenschaften. Die autologe Knochen transplantation gilt weiterhin als Goldstandard für den knöchernen Gewebeersatz (Samartzis et al. 2005).

1.5 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die die Zellteilung und Zelldifferenzierung von Vorläuferzellen beeinflussen, indem sie an membranständige Rezeptoren binden und eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Bei der Versorgung von knöchernen Defekten mit Knochenersatzmaterialien kann die Kombination des Trägermaterials mit osteoinduktiven Wachstumsfaktoren die Fähigkeit zur Geweberegeneration verbessern (Gothard et al. 2014). Für die Differenzierung von Stammzellen zu Knochenzellen sind in der Literatur in den letzten Jahren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beschrieben worden. So wurden die Proteine *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), *Fibroblast Growth Faktor* (FGF), *Platelet-Derived Growth Faktor* (PDGF), *Transforming Growth Faktor beta* (TGF- β) und *Vascular Endothelial Growth Faktor* (VEGF) in Studien untersucht, um nur eine Auswahl an Wachstumsfaktoren zu nennen. Bereits 1973 konnte Urist in Versuchen zeigen, dass durch die Verwendung von Knochenmatrixgelatine die Knochenneubildung gesteigert werden konnte. Er postulierte, dass osteoinduktive Proteine, die er als *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) bezeichnete, die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen induzieren können (Urist et al. 1973). In der Folge wurden BMPs als Wachstumsfaktoren der Knochenregeneration beschrieben, die auf die Zelldifferenzierung und gewebige Gestaltung von Knochenzellen bzw. Knochengewebe einwirken, indem die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten stimuliert und die Proliferation von Osteoblasten gesteigert wird (Sikavitsas et al. 2001).

Urist beschrieb eine dosisabhängige Wirksamkeit der BMPs. So bewirkt eine niedrige Konzentration die Chemotaxis und Zellproliferation, eine hohe Konzentration führt zu Zelldifferenzierung und Knochenbildung (Urist 1997).

Heute sind zwanzig verschiedene humane BMPs bekannt, von denen acht eine osteochondrale Wirkung besitzen (Even et al. 2012). Speziell BMP-2 konnte bereits in in vivo Studien als potenter Osteoinduktor identifiziert werden. Bezüglich der zu verwendenden Konzentrationen der BMPs besteht jedoch aktuell noch kein klarer Konsens. In Tierstudien wurden Konzentrationen von 5µg bis zu 100mg im Großtierversuch und 0,1µg bis zu 5mg im Kleinterversuch verwendet (Gothard et al. 2014).

Fibroblast Growth Faktor (FGF) entstammt einer großen Familie von Wachstumsfaktoren mit über 20 verschiedenen Vertretern, die auf eine Vielzahl von biologischen Prozessen einwirken und somit die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen fördern (Ornitz und Itoh 2001, Hirata et al. 2013).

Platelet-Derived Growth Faktor (PDGF) wird von Thrombozyten produziert und besitzt eine chemotaktische Wirkung auf Osteoblasten. Außerdem stimuliert PDGF die Zellteilung von Stammzellen der angiogenen Differenzierungsreihe (Schliephake 2002). Heute sind fünf Isoformen bekannt und seine Wirksamkeit für die Regeneration von Knochengewebe wurde durch in vivo Studien belegt (Herford et al. 2012).

Transforming Growth Faktor beta (TGF-β) nimmt eine zentrale Stellung in der Knochengewebeheilung ein, indem es die Knorpelbildung als Vorläuferstruktur von Knochengewebe fördert (Dimitriou et al. 2005). Seine Bedeutung für die Stimulation der Knorpelbildung konnte durch in vivo Studien belegt werden (Ripamonti et al. 2009).

Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) steigert die Vaskulogenese (Neubildung von Blutgefäßen aus Vorläuferzellen des Gefäßendothels) und die Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen aus vorbestehenden Blutgefäßen) und verbessert somit die lokale Durchblutungssituation (Byrne et al. 2005). Dadurch werden nicht nur Nährstoffe und Sauerstoff, sondern auch mesenchymale Stammzellen in höheren Konzentrationen zur Regeneration des Knochengewebes zur Verfügung gestellt (Geiger et al. 2007). Doch wirkt VEGF auch direkt auf die Osteoneogenese, indem es chemotaktisch nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Osteoblasten wirkt (Li et al. 2005). Außerdem befinden sich VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen und auf Osteoblasten, wodurch direkt die osteoblastäre Differenzierung stimuliert werden kann (Deckers et al. 2000).

Neben der Einzelanwendung sind auch Kombinationen von Wachstumsfaktoren untersucht worden, um die Effektivität der Osteogenese zu verbessern. Die Kombination von BMP und VEGF hat sich dabei als effektiv erwiesen und konnte laut Studien eine verbesserte Knochenregeneration im Vergleich zur Einzelapplikation erzielen (Xiao et al. 2011, Zhang et al. 2011). VEGF verbessert die lokale Durchblutung im Knochendefekt und liefert somit Sauerstoff, Nährstoffe und Zellen, die durch BMP zur weiteren osteogenen Differenzierung angeregt werden können (Gothard et al. 2014).

1.6 Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Trägermaterialien

Der Effekt von Wachstumsfaktoren im Knochendefekt ist jedoch nach lokaler Applikation nur begrenzt wirksam, da das Protein rasch diffundiert und absorbiert wird. Um die Prinzipien der Geweberegeneration durch osteogene Zellen, Osteoinduktion und Osteokonduktion in vivo umzusetzen, erwies sich die kontrollierte Freisetzung (*slow release*) von Wachstumsfaktoren aus einem Trägermaterial am geeignetsten (Takaoka et al. 1991). Obwohl die Freisetzungskinetik von Wachstumsfaktoren in den letzten Jahren intensiv erforscht wurde, gibt es, wie oben bereits beschrieben, bisher noch keine Übereinkunft über die zu verwendenden Konzentrationen der Wachstumsfaktoren. Außerdem gibt es bisher noch keine Einigkeit über die ideale Beladung der Trägermaterialien mit den Proteinen (Schliephake et al. 2007). So gibt es Versuche Wachstumsfaktoren in die Porenstruktur der Trägermaterialien zu saugen, um eine Freisetzung aus dem Material zu ermöglichen, was jedoch zu einer schnellen Entladung des Trägers führt und nur eine kurze Phase der osteoinduktiven Wirksamkeit von ca. 48h verspricht (Kanematsu et al. 2004). In anderen Versuchen wurde eine Beimpfung eines Polylaktid- Trägers mit Wachstumsfaktoren durch Begasung untersucht, wodurch es möglich war, Wachstumsfaktoren mittels CO₂ – Hochdruckverfahren in das Trägermaterial einzubringen (Tschakaloff et al. 1996). Später konnte sogar gezeigt werden, dass durch Begasung von Trägern die Freisetzung des Wachstumsfaktors je nach Konzentration bis zum 27 Tag anhalten kann (Schliephake et al. 2007).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Nachfrage nach Therapieansätzen zur Behandlung besonders größerer knöcherner Defekte (*Critical Size Defects*) Ärzte schon seit vielen Jahren beschäftigt, ist aktuell keines der in der klinischen Anwendung befindlichen Knochenersatzmaterialien in der Lage, die erwünschten Eigenschaften eines Ersatzmaterials vollständig zu erfüllen (Samartzis et al. 2005). Für die Differenzierung und das Wachstum von osteogenen Zellen in einem osteokundktivem Trägermaterial konnten neue Ansätze eine Verbesserung der Knochenregeneration durch simultane Freisetzung der Wachstumsfaktoren BMP und VEGF zeigen (Xiao et al. 2011, Zhang et al. 2011). Da jedoch der Effekt der Wachstumsfaktoren durch eine lokale Applikation nur unzureichend langanhaltend ist, stellt die kontrollierte Freisetzung (*slow release*) von Wachstumsfaktoren aus dem Trägermaterialien einen vielversprechenden Ansatz dar, wobei es aktuell noch keine Übereinkunft gibt, in welchen Konzentrationen Wachstumsfaktoren verwendet werden sollten (Schliephake et al. 2007).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob durch die kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF die Knochenregeneration in vivo aus Poly-laktid/Kalziumkarbonat (PDLLA/CaCO₃)-Komposit-Scaffolds verbessert werden kann. Darüber hinaus wurde der neu gebildete Knochen im Hinblick auf die Auswirkung verschiedener Konzentrationen in Einzeldosierung und in Kombination von BMP und VEGF untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Laborausstattung

Labor- Rollmischer:	Bibby Scientific Limited Beacon Road, Stone UK-Staffordshire ST15 0SA www.stuart-equipment.com
Lyophile (Gefriertrockner):	Christ-Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH An der Unteren Söse 50 D-37520 Osterode am Harz www.martinchrist.de
Hohlform:	Polytetrafluorethylen mit Edelstahlplatten Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, KLS Martin Group Ludwigstaler Str. 132 D-78532 Tuttlingen www.klsmartin.com
Diamantbandsäge:	EXAKT Robert-Koch-Str. 5 D-22851 Norderstedt www.exakt.de
Trenndünnschlifftechnik:	EXAKT Robert-Koch-Str. 5 D-22851 Norderstedt www.exakt.de
Mikroskop:	Olympus Dotslide 2.0, Olympus Deutschland GmbH Wendenstrasse 14 - 18 20097 Hamburg www.microscopy.olympus.eu
Pipetten:	Eppendorf Peter-Henlein-Straße 2 50389 Wesseling-Berzdorf www.eppendorf.de
Pipettenspitzen und Röhrchen:	Sarstedt AG & Co Postfach 1220 51582 Nümbrecht www.sarstedt.com

Objekträger:	patho-service GmbH Barsbütteler Weg 6 D-22113 Oststeinbek www.patho-service.de
Makrolon-Käfig (Typ IV)	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG Fabrikstraße 2 D- 79312 Emmendingen www.ehretlab.com
Holzgranulat Linguacel Select	Rettenmeier Holding AG Industriestraße 1 D-91634 Wilburgstetten www.retteneier.com

2.2 Reagenzien und Lösungen

Polylactid-Pulver:	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, KLS Martin Group Ludwigstaler Str. 132 D-78532 Tuttlingen www.klsmartin.com
rhBMP-2:	RELIAtech GmbH Lindener Straße 15 D-38300 Wolfenbüttel www.reliatech.de
rhVEGF-165:	RELIAtech GmbH Lindener Straße 15 D-38300 Wolfenbüttel www.reliatech.de
Technovit9100 neu:	HeraeusKulzer GmbH Grüner Weg 11 D-63450 Hanau www.heraeus-dental.de
Löfflers Methylenblaulösung:	Merck KGaA Frankfurter Str. 250 D-64293 Darmstadt www.merckmillipore.com
Alizarinrot S:	Merck KGaA Frankfurter Str. 250 D-64293 Darmstadt www.merckmillipore.com

Entellan:	Merck KGaA Frankfurter Str. 250 D-64293 Darmstadt www.merckmillipore.com
Locit 420	Henkel AG & Co. KGaA Henkelstraße 67 D-40589 Düsseldorf www.loctite.de
Domitor	Orion Corporation Orionintie 1A FI-02200 Espoo www.orion.fi
Ketavet	Pfizer GmbH Direktionsbereich Tiergesundheit Linkstraße 10 D-10785 Berlin www.online.zoetis.com
Temgesic	Essex Pharma GmbH Thomas-Dehler-Straße 27 D-81737 München www.msd.de
Antisedan	Orion Corporation Orionintie 1A FI-02200 Espoo www.orion.fi
Rimadyl	Pfizer GmbH Direktionsbereich Tiergesundheit Linkstraße 10 D-10785 Berlin www.online.zoetis.com
Metapyrin	Serumwerk Bernburg AG Hallesche Landstrasse 105 b D-06406 Bernburg www.serumwerk.com

2.3 Herstellung der Implantate

In der vorliegenden Studie wurde als osteokonduktives Trägermaterial Poly-D, L-Milchsäure (PDLLA) in Kombination mit Kalziumkarbonat (CaCO_3) als Komposit- Scaffold verwendet. Das Kompositmaterial wurde im Verhältnis 4:1 (PDLLA: CaCO_3) zusammengefügt und je nach Gruppenzugehörigkeit mit rhBMP-2 bzw. rhVEGF-165 in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen in wässriger Lösung angesetzt.

Der in dieser Studie verwendete rekombinante humane Wachstumsfaktor BMP (rh-BMP-2, RELIAtech GmbH, Wolfenbüttel) wurde durch ein etabliertes Verfahren mittels *E. coli*-Bakterienkultur gewonnen (Vallejo et al. 2002). Seine Wirksamkeit konnte bereits in einer Vielzahl von Studien getestet werden (Murata et al. 1999, Dragoo et al. 2003, Pang et al. 2004). Auch VEGF wurde in rekombinanter Form verwendet (rh-VEGF-165, RELIAtech GmbH, Wolfenbüttel), wobei auch bei diesem Wachstumsfaktor die biologische Wirksamkeit bereits nachgewiesen werden konnte (Drake et al. 2006).

Anschließend wurde diese Lösung auf dem Rotorschüttler durchmischt und bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Danach erfolgten die Schockgefrierung mittels Stickstoff und die Gefriertrocknung über Nacht. Die Lyophilisierung wurde bei $-15\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in einer Vakuumkammer und bei $-85\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Eiskondensator über 8 h durchgeführt (Fa. Christ Alpha 2-4, Osterode am Harz). Das Lyophilisat wurde in $8 \times 3\text{ mm}$ PEF Hohlformen eingebracht. Die Begasung der Scaffolds erfolgte durch KLS-Martin (Fa. KLS-Marin, Tuttlingen) bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 76,1 bar über 2 h. Die so erhaltenen PDLLA/ CaCO_3 -Scaffolds wiesen eine Korngröße von $12\text{ }\mu\text{m}$ auf und wurden praeoperativ mittels einer Lochstanze auf einen Durchmesser von 5 mm verkleinert (Abb. 1).

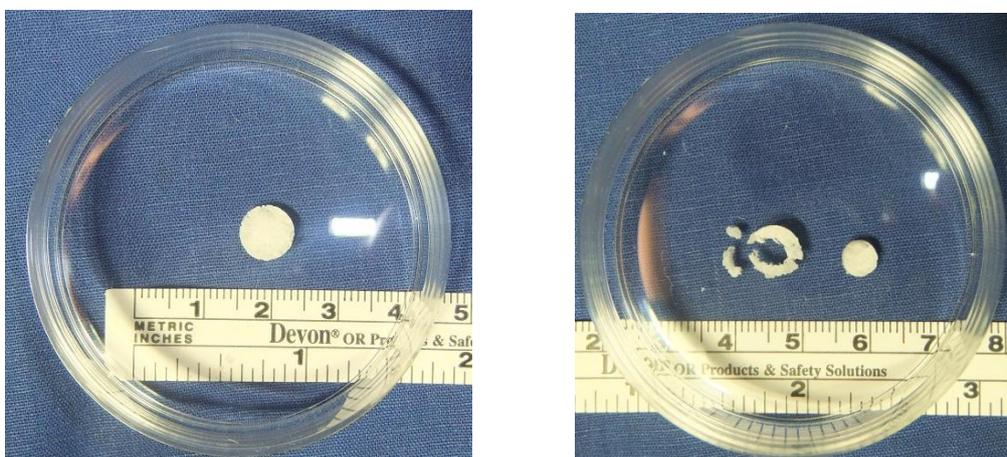


Abbildung 1:a) PDLLA/ CaCO_3 -Scaffolds aus PEF Hohlform, b) Scaffold nach Größenanpassung mit Lochstanze

2.4 Charakterisierung der Versuchstiere und Tierhaltungsbedingungen

Alle Ratten waren männliche Individuen (*Rattus norvegicus*, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) und wurden in einem Alter von 3-6 Monaten mit einem Gewicht von 300-600 Gramm operiert. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum im zentralen Tierlabor der Georg-August Universität Göttingen. Zur Unterbringung der Tiere wurden Macralon-Käfige Typ IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen) mit Holzfaser-Granulaten (Lingucel® Select, Firma: L. Rettenmaier, Wilburgstetten) verwendet. Praeoperativ lagen die Gruppengrößen bei 5 Tieren pro Käfig, postoperativ bei 3 Tieren pro Käfig.

Die Haltungsbedingungen umfassten darüber hinaus einen Hell-/ Dunkel- Wechsel von 12 h, die Luftfeuchtigkeit betrug 50-60 % bei einer Raumtemperatur von 20-24 °C. Gefüttert wurden die Versuchstiere mit Standard- Nagerfutter (Sniff Haltungsfutter, Standarddiät pro Ratte 10mm Pellets, ad libitum) und Leitungswasser, ad libitum. Wöchentlich wurden die Tiere umgesetzt und mit neuer Einstreu versehen. Die Genehmigung des Tierversuches erfolgte durch die Tierschutzkommission der Bezirksregierung Braunschweig am 03.12.2010 (Aktenzeichen: 33.9-42502-04-10/0223).

2.5 Gruppeneinteilung und Gruppengröße

Einzel dosierung	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7
Unterkiefer links	Blank	0,24µg VEGF	1,5µg VEGF	6µg VEGF	24µ BMP	48µg BMP	96µg BMP
Unterkiefer rechts	Leer	Blank+0,24µg VEGF	Blank+1,5µg VEGF	Blank+6µg VEGF	Blank+24µg BMP	Blank+48µg BMP	Blank+96µg BMP

Kombinationen	Gruppe 8	Gruppe 9	Gruppe 10	Gruppe 11
Unterkiefer links	1,5µg VEGF+24µg BMP	6µg VEGF+24µg BMP	1,5µg VEGF+48µg BMP	6µg VEGF+48µg BMP
Unterkiefer rechts	Blank+1,5µg VEGF+24µg BMP	Blank+6µg VEGF+24µg BMP	Blank+1,5µg VEGF+48µg BMP	Blank+6µg VEGF+48µg BMP

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

2.6 Operation

Die operativen Maßnahmen an den Versuchstieren wurden im tierexperimentellen Operationssaal der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Nach Feststellung des Ausgangsgewichtes erfolgte die Narkose der Tiere mit Medetomin (Domitor[®], 60 µg/kg KG) und Ketamin (Ketavet[®], 14 mg/kg KG) rechtsseitig intraperitoneal mit Tiefenstop. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes im Interdigitalraum wurden die Augen mit Bepanthen-Augensalbe abgedeckt.

Anschließend erfolgte die Rasur des Operationsfeldes sowie die Reinigung und Desinfektion der Haut der Tiere. Für die Durchführung der Operation wurden die Versuchstiere auf die Seite gelagert. Um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden, wurden die Ratten mit einem Wärmekissen warm gehalten. Zur Schmerzreduktion erfolgte praeoperativ s.c. die Injektion mit Buprenorphin (Temgesic[®], 0,05 mg/kg KG).

Das operative Vorgehen war im Unterkieferbereich seitengleich: Zunächst erfolgte die Darstellung des Unterkiefers durch einen ca. 2 cm langen Hautschnitt submandibulär (Abb. 2a) und Präparation durch das Weichgewebe. Anschließend erfolgte die Präparation des Musculus masseter unter Schonung der nervalen Strukturen und des Ausführungsganges der Glandula parotis. Danach wurde das Weichgewebe lingual und bukkal vom Unterkieferrand mittels eines Raspatoriums abgelöst sowie der Muskelanteil nach kranial mobilisiert. Nachfolgend wurde im Bereich des Processus angularis ein standardisierter *Critical Size Defekt* von 5 mm Durchmesser bikortikal im Bereich des aufsteigenden Unterkieferastes gesetzt unter strenger Aussparung der Nervenebene (Abb. 2b).

Abhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe wurde nun unterschiedlich weiter verfahren: In Gruppe 1 wurde im linken Unterkiefer ein PDDL/CaCO₃-Komposit-Scaffold ohne Medikamentenzusatz press-fit eingebracht (Abb. 2c). Im rechten Unterkiefer wurde der Defekt ohne weitere Therapie belassen. Beidseits erfolgte der mehrschichtige Wundverschluss mit Vicryl der Stärke 4-0. In den Gruppen 2-11 wurden jeweils im linken Unterkiefer die mit den Medikamentenzusätzen beladenen PLDDA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds und im rechten Unterkiefer native PLDDA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds unter zusätzlicher topischer Applikation der äquivalenten Dosis des Medikamentes ebenfalls im press-fit-Verfahren eingebracht (Tab. 1). Auch hier erfolgte anschließend der mehrschichtige Wundverschluss mit Vicryl der Stärke 4-0.

Abschließend wurde ein RFID- Transponder im Nackenbereich zur eindeutigen Identifikation der Tiere implantiert. Nach gewichtsadaptierter postoperativer Gabe von Buprenorphin (Temgesic[®], 0,05 mg/kg KG) erfolgte die Teilantagonisierung durch Atipamezol (Antisedan[®], 2 mg/kg KG s.c.). Bis zum Abklingen des Ketaminüberhanges wurden die Versuchstiere in Einzelkäfige gesetzt. Die Operationdauer betrug für jedes Tier etwa 45 Minuten.



Abbildung 2: Ratte intraoperativ: a) Hautschnitt submandibulär, b) frei präparierter Unterkiefer mit *Critical Size Defekt* von 5mm, c) Insetiertes Implantat

2.7 Postoperative Tierhaltung

Bis zum 2. postoperativen Tag erfolgte die regelhafte Gabe von Temgesic (0,05-0,02 mg/kg KG s.c., 2x tgl.), bei Anzeichen von Schmerzen wurde die Medikamentengabe verlängert. Ab dem 3. postoperativen Tag erhielten die Versuchstiere Carprofen (Rimadyl[®], 5 mg/kg KG s.c. 1x tgl.). Darüber hinaus wurde das Trinkwasser mit Metamizol (Metapyrin[®], 3 ml/ 1 Liter Trinkwasser bis zum 14. postoperaiven Tag) angereichert.

Die Tiere wurden im Bereich der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Es erfolgten regelmäßige Kontrollen und Überwachungen des Gesundheitszustandes der Tiere. Als Abbruchkriterien galten starke Infektionen der Polymerträger und/oder Kieferbruch der Versuchstiere.

2.8 Versuchsabschluss

Nach Ablauf der Beobachtungszeiträume 1 Woche, 4 Wochen, 13 Wochen und 26 Wochen wurden die entsprechenden Tiergruppen durch CO₂-Applikation in einem abgeschlossenen Raum getötet. Die Inhalation des Gases bewirkte zunächst eine Bewusstlosigkeit innerhalb weniger Sekunden und einen Herz-Kreislaufstillstand nach ca. 1 Minute. Nach der Euthanasie wurden die Unterkieferanteile linksseitig und rechtsseitig entnommen und der weiteren histologischen Aufbereitung zugeführt (Abb. 3 a und b).



Abbildung 3: Entnommene Unterkieferpräparate a) Ansicht von ventrolateral b) Ansicht von distomedial

2.9 Histologische Bearbeitung

2.9.1 Einbettung in Technovit und Herstellung der Hartschnittpräparate

Die histologische Bearbeitung erfolgte im Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Die entnommenen Unterkieferpräparate wurden zunächst in 4 % neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Dehydratation erfolgte durch die Applikation von Ethanol in aufsteigender Konzentration für jeweils 24 h (Tabelle 2).

Anschließend wurden die vorbereiteten Unterkieferpräparate in Technovit 9100 NEU (Haereus Kulzer, Wehrheim) eingebettet (Tab. 3). Für die endgültige Aushärtung der Blöcke erfolgte die Lagerung im Kühlschrank bei -3 °C für 48 h.

Dehydratation, Intermedium und Immersion (Präinfiltration 1-3, Infiltration)	
Entwässerung 1	70 % Ethanol für 24 h
Entwässerung 2	70 % Ethanol für 24 h
Entwässerung 3	90 % Ethanol für 24 h
Entwässerung 4	96 % Ethanol für 24 h
Entwässerung 5	96 % Ethanol für 24 h
Entwässerung 6	Ethanol abs. für 24 h
Entwässerung 7	Ethanol abs. für 24 h
Entwässerung 8	Ethanol abs. für 24 h

Tabelle 2: Protokoll der Dehydratation

Intermedium 1	Xylol für 24 h
Intermedium 2	Xylol für 24 h
Intermedium 3	Xylol für 24 h
Präinfiltration 1	Xylol/Technovit 9100 NEU für 24 h
Präinfiltration 2	Basis für 24 h
Präinfiltrationslg. 1	Technovit 9100 NEU + Härter für 24 h
Präinfiltrationslg. 2	Technovit 9100 NEU + Härter für 24 h
Infiltrationslg. 1	Technovit 9100 NEU, Basis + Härter + PMMA-Pulver für 24 h
Infiltrationslg. 2	Technovit 9100 NEU, Basis + Härter + PMMA-Pulver für 24 h
Infiltrationslg. 3	Technovit 9100 NEU, Basis + Härter + PMMA-Pulver für 24 h

Tabelle 3: Protokoll Einbettung in Technovit 9100 NEU

2.9.2 Herstellung der Trenndünnschliff-Präparate

Zunächst wurden die Präparatblöcke mit dem Sekundenkleber Locit 420 (Henkel, Düsseldorf) auf den Objektträgern fixiert und mit einer Diamantbandsäge (Exakt, Norderstedt) bis auf eine Schichtstärke von ca. 300 µm reduziert. Die Schliffebene wurde so gewählt, dass das Zentrum des ursprünglichen Defektes angeschnitten wurde.

Nach dem Trenndünnschliffverfahren erfolgte zunächst der Schliff mit einer 800er Körnung bis auf eine Schliffdicke von ca. 140 µm. Anschließend wurden die Präparate mit einer 1200er Körnung bis auf eine Schliffdicke von ca. 30-40 µm gebracht. Abschließend wurde der Schliff mit einer Silikonscheibe poliert.

2.10 Alizarinrot- Methyleneblau- Färbung nach Smith- Karagianes (Smith u. Karagianes 1974)

Die Färbung wurde nach standardisiertem Protokoll durchgeführt: Methyleneblau wurde mittels Magnetrührer auf einer Heizelektrode auf 80 °C erhitzt und die Präparatschliffe für 30 Sekunden eingetaucht. Danach wurden die Schliffe mit destilliertem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung mit Alizarinrot bei Raumtemperatur für 90 Sekunden. Erneut wurde mit destilliertem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet. Zuletzt erfolgte die Eindeckelung mit Entellan (Merck, Darmstadt) über Nacht. Durch die Anfärbung wird kalzifizierter Knochen orange, kollagenes Bindegewebe dunkelblau und Weichgewebe hellblau dargestellt (Abb. 4).

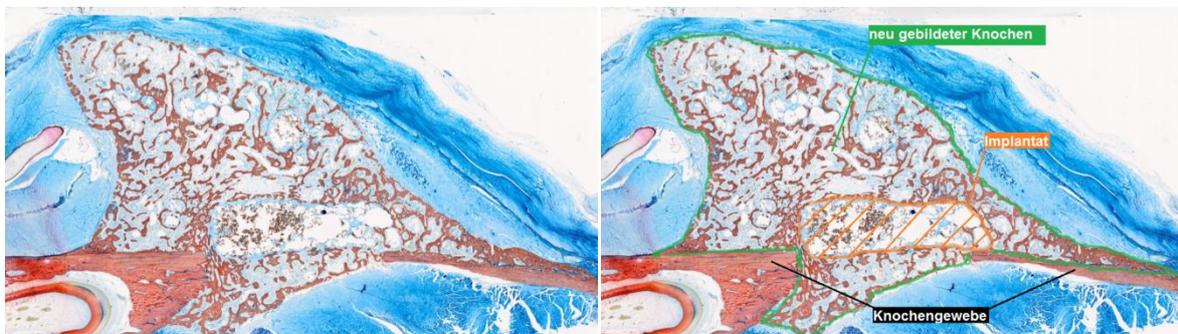


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines angefärbten Schliffs

2.11 Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopische Erfassung der im Präparatschliff dargestellten neugebildeten Knochensubstanz im Bereich der *Critical Size Defekte* erfolgte durch Lichtbildmikroskopie bei 10- facher Vergrößerung unter Verwendung des Dotslide-Systems 2.0 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg), wodurch es möglich war, mittels Ladevorrichtung bis zu 50 verschiedene Objektträger automatisch nacheinander digital zu erfassen.

2.12 Histomorphometrische Auswertung

Die mikroskopisch erfassten Schliffbilder wurden mit Hilfe der Software Photoshop dargestellt und die Fläche des neu gebildeten Knochengewebes umfahren. Um die prozentuale Knochenneubildung zu erfassen wurden die Gewebeanteile, die bezüglich der Farbintensität oberhalb einer vorher definierten Schwelle lagen, ausgemessen und mit der Gesamtfläche der Gewebeneubildung ins Verhältnis gesetzt. So konnte neben der Fläche der Knochenneubildung in μm , die bei Betrachtung aller Schnitte deutlichen Schwankungen unterworfen war, auch die prozentuale Knochenneubildung erfasst werden (Abb. 5).

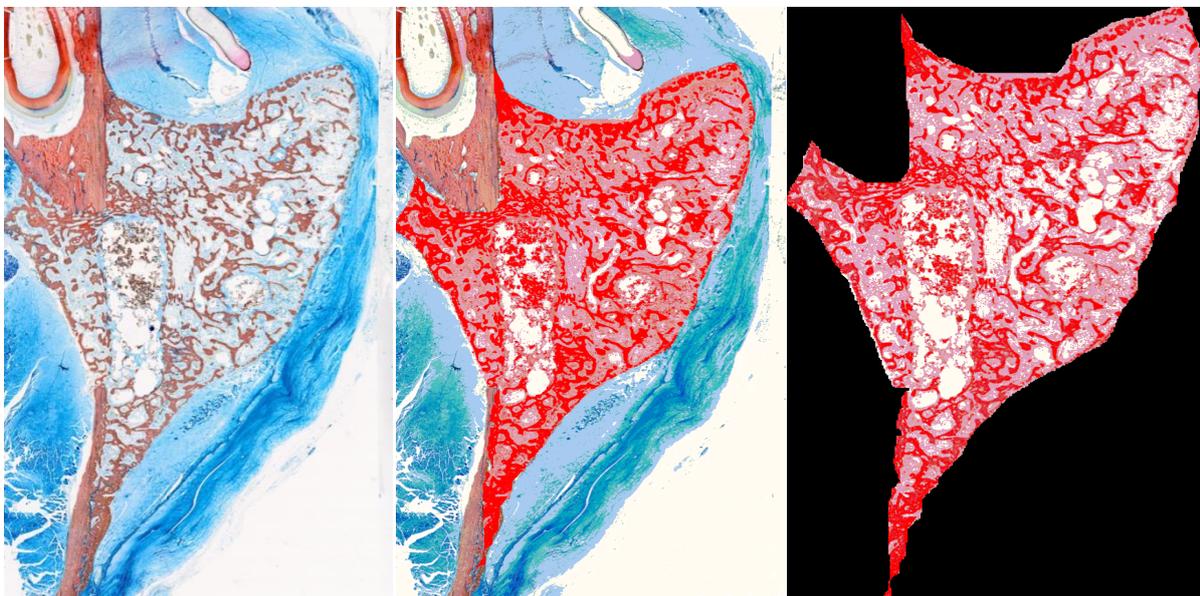


Abbildung 5: Erfassung und Markierung des neu gebildeten Knochengewebes

2.13 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch freundliche Unterstützung des Instituts für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen (Leiter: Prof. Dr. Tim Friede). Aufgrund einer normalverteilten Datenlage der Versuchsergebnisse, wurde die statistische Aufbereitung der Versuchsergebnisse mittels Varianzanalyse (repeated-measure-ANOVA) durchgeführt. Zusätzlich wurden arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Das Signifikanzniveau lag bei allen durchgeführten Tests bei $\leq 0,05$. Für die Ermittlung der Varianzanalyse wurde das Statistikprogramm SAS (SAS Institute, Cary, North Carolina) verwendet. Für die tabellarische Darstellung der Ergebnisse verwendeten wir das Programm Excel von Microsoft Office (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten).

3. Ergebnisse

3.1 Histomorphometrische Analyse

Die Histomorphometrische Analyse zeigt in Abb. 6 beispielhaft zu den Beobachtungszeitpunkten 4 Wochen, 13 Wochen und 26 Wochen das in dem Knochendefekt lokalisierte Implantat mit zunehmender Osteoneogenese.

Bildet sich zunächst noch Knochengewebe vermehrt distal und mesial des Implantates, so konnte im weiteren Verlauf eine Knochenapposition Richtung bukkal beobachtet werden, wobei es durch weichgewebige Limitationen zur Abflachung der Knochenneubildung kommt. Außerdem ist erkennbar, dass das Implantat mit voranschreitender Zeit vom Organismus resorbiert wird und seine Abgrenzung zum neu gebildeten Knochengewebe verliert (Abb. 6c u. 7c). Die Morphologie und die Ausdehnung der Osteoneogenese im Bereich des *Critical Size Defects* zeigt keine Unterschiede zwischen den beiden Applikationsgruppen *slow release* und lokale Darreichung (Abb. 6 u.7).

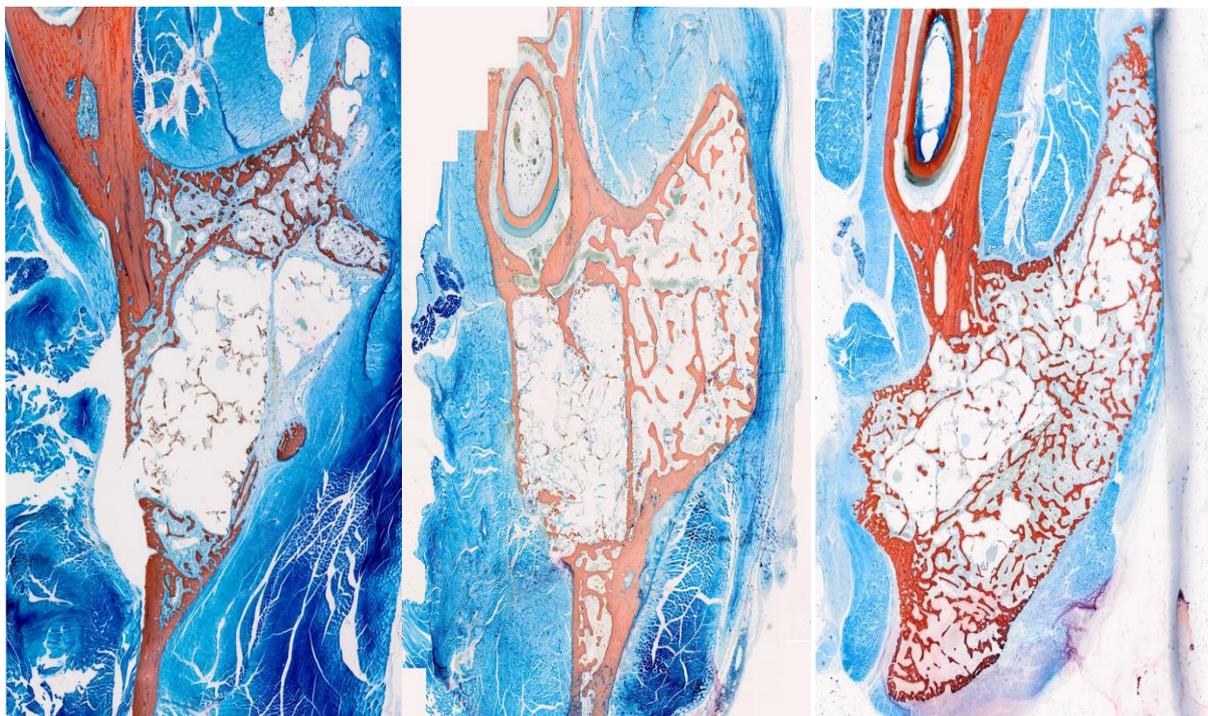


Abbildung 6: Applikationsgruppe *slow release*, a) 4 Wochen, b) 13 Wochen, c) 26 Wochen

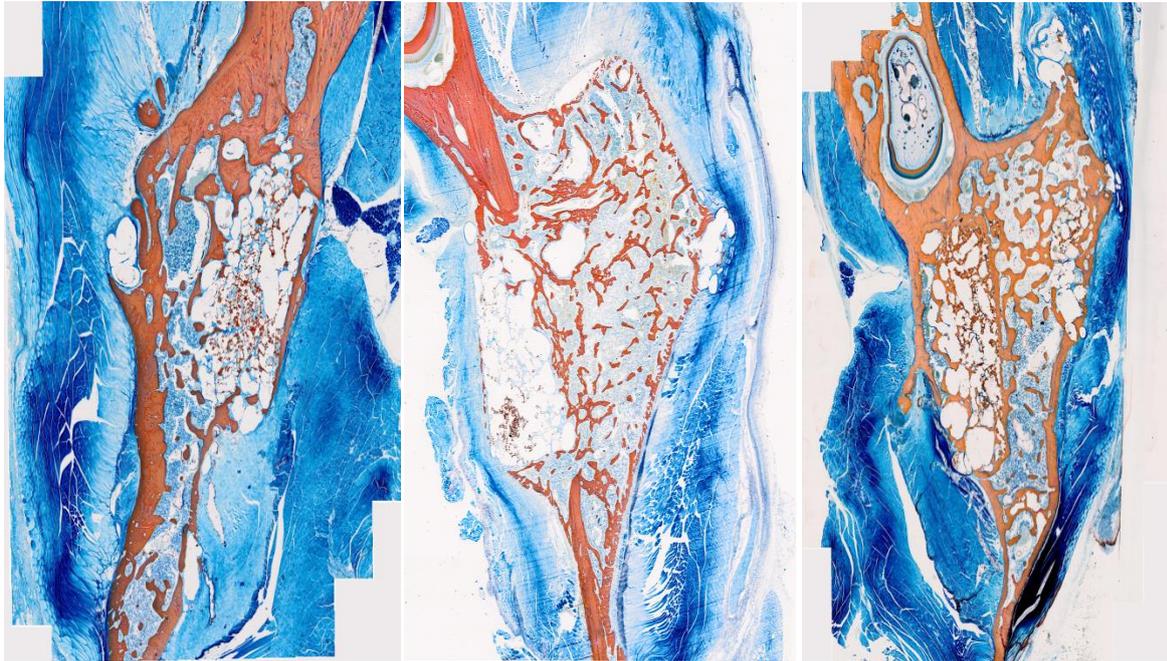


Abbildung 7: Gruppe der lokalen Applikation a) 4 Wochen, b) 13 Wochen, c) 26 Wochen

3.2 Vergleich der Einzeldosierungen von BMP

Bei Betrachtung der Einzeldosierungen von BMP zu den Auswertungszeitpunkten 4 Wochen, 13 Wochen und 26 Wochen, jeweils als *slow release* (blau) und als lokale Applikation (rot), kann man erkennen, dass zunächst nach 4 Wochen durch Steigerung der BMP Konzentrationen von 24 μg über 48 μg auf 96 μg eine stärkere Knochenneubildung in beiden Applikationsgruppen zu messen war (Abb. 8). Abweichend hiervon verhält sich nur die Konzentrationsgruppe Blank + 48 μg .

Nach 13 Wochen lässt sich diese Entwicklung nicht mehr feststellen. Unabhängig von der Applikationsform kommt es zu keiner Verbesserung der Knochenneubildung durch Erhöhung der BMP Dosierung. In der Applikationsgruppe *slow release* nimmt die Knochenregenerationsrate durch BMP Erhöhung in der 13. Woche sogar ab.

Nach 26 Wochen kann man erneut beobachten, dass die Osteoneogenese mit zunehmender BMP Konzentration ansteigt, unabhängig davon, ob die Wachstumsfaktoren lokal appliziert oder durch einen *slow release* freigesetzt wurden.

Insgesamt lässt sich also keine Zunahme der Knochenneubildungsrate durch kontrollierte Freisetzung (*slow release*) von BMP im Vergleich zur lokalen Applikation feststellen (Abb. 8).

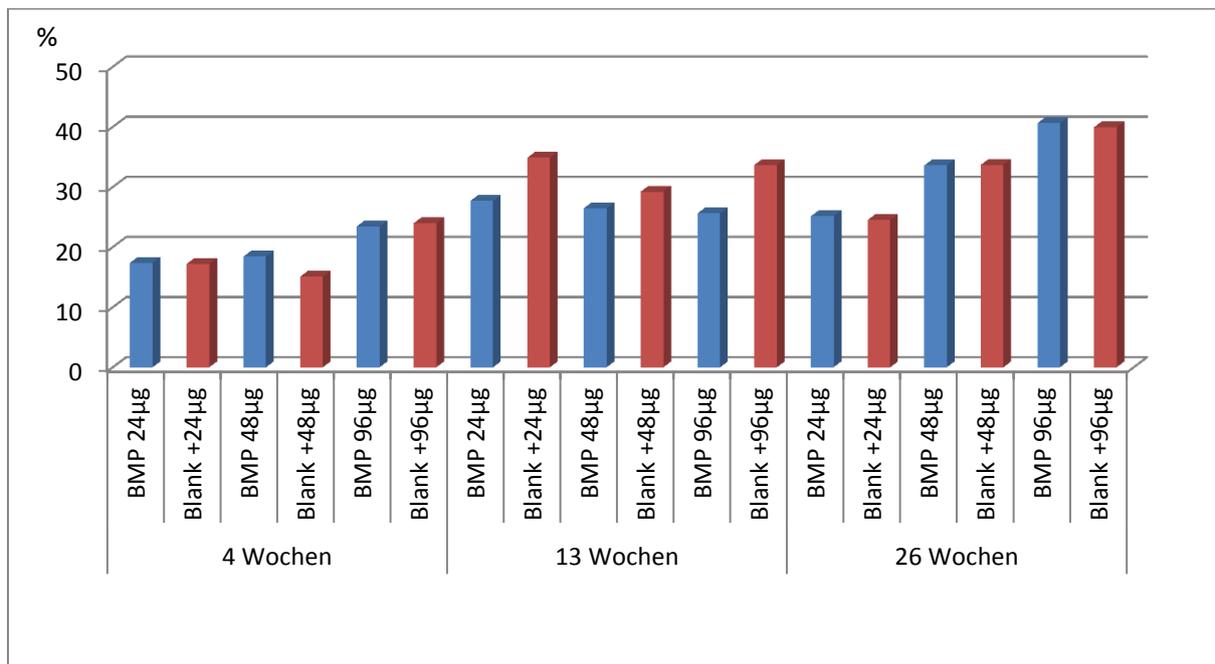


Abbildung 8: Vergleich der Einzeldosierungen von BMP

In der Zusammenfassung gemittelt über die Auswertungszeiträume 4 Wochen bis 26 Wochen der mit dem Wachstumsfaktor BMP in verschiedenen Konzentrationen behandelten Gruppen bestätigt sich die bereits bekannte Dosisabhängigkeit von BMP bezüglich der Knochenneubildungsrate in der Applikationsgruppe *slow release* (Abb. 9). Je höher die verabreichte Konzentration von BMP im Knochendefekt, desto mehr Knochengewebe entsteht.

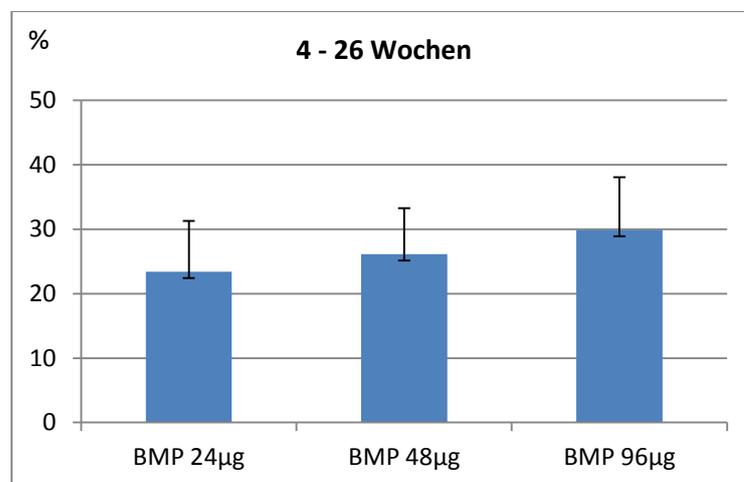


Abbildung 9: Zusammenfassung von Auswertungszeiten der Konzentrationen von BMP

3.3 Vergleich der Einzeldosierungen von VEGF

Die Erfassung der Einzeldosierung des Wachstumsfaktors VEGF nach 1 Woche, 4 Wochen und 13 Wochen jeweils als *slow release* (blau) und als lokale Applikation (rot) ergab insgesamt eine geringere Knochenneubildungsrate als in der Gruppe der mit BMP beimpften Implantate (Abb. 10). Die Osteoneogenese zeigte jedoch weder eine Abhängigkeit von der Konzentration von VEGF noch von der Applikationsform des Wachstumsfaktors. Die höchste Knochenneubildungsrate zeigte sich in der Gruppe der kontrollierten Freisetzung (*slow release*) mit 1,5 µg VEGF nach 4 Wochen (Abb. 10).

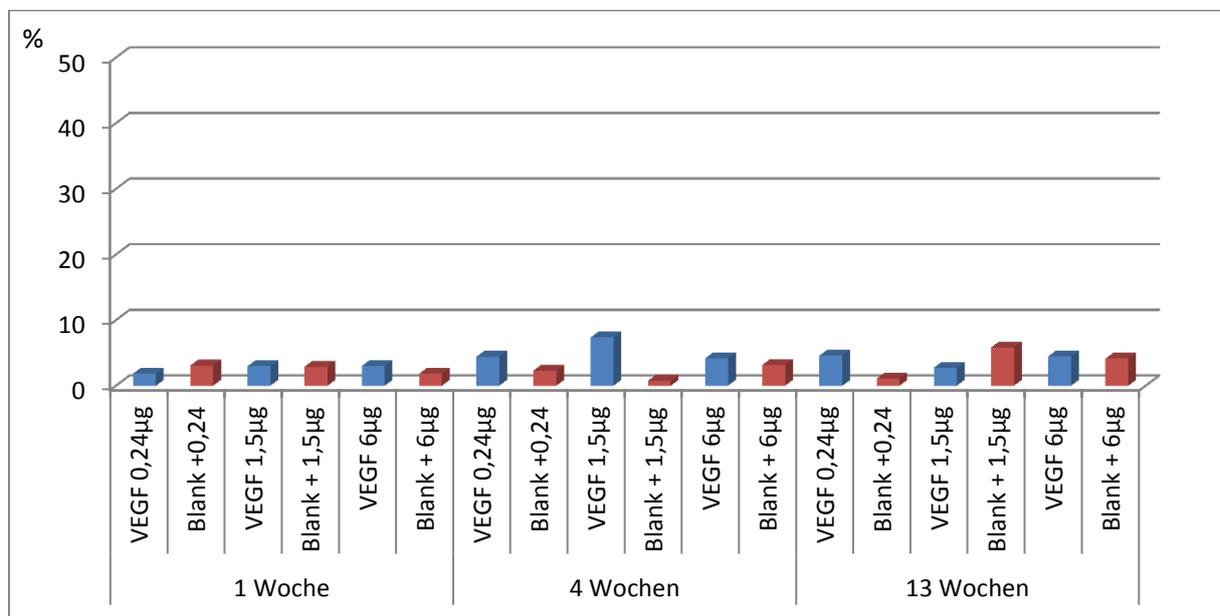


Abbildung 10: Vergleich der Einzeldosierungen von VEGF

3.4 Vergleich der Kombinationsdosierungen von BMP und VEGF

Die Erfassung der Knochenneubildungsrate, stimuliert durch die Kombination von BMP und VEGF in verschiedenen Konzentrationen, zeigt in der Gruppe der niedrigen Konzentrationskombinationen mit 1,5µg VEGF + 24µg BMP im Verlauf der Beobachtung eine kontinuierliche Steigerung der Osteoneogenese von der 4. Woche bis hin zur 26. Woche sowohl für die Applikationsform *slow release* als auch für die lokale Applikation (Abb. 11). Darüber hinaus zeigt die Konzentrationskombination 1,5µg VEGF + 48µg BMP in lokaler Applikation eine kontinuierliche Steigerung der Knochenneubildung bis zur 26. Woche.

In den anderen Konzentrationsgruppen von BMP und VEGF lässt sich dieser Trend nicht feststellen. Zwar kommt es zunächst zu einer Zunahme der Osteoneogenese durch Steigerung der Konzentrationen nach 13 Wochen in allen Konzentrationsgruppen, nach 26 Wochen geht die Knochenneubildungsrate jedoch in den Gruppen der hohen Kombinationsdosierung wieder zurück (Abb. 11).

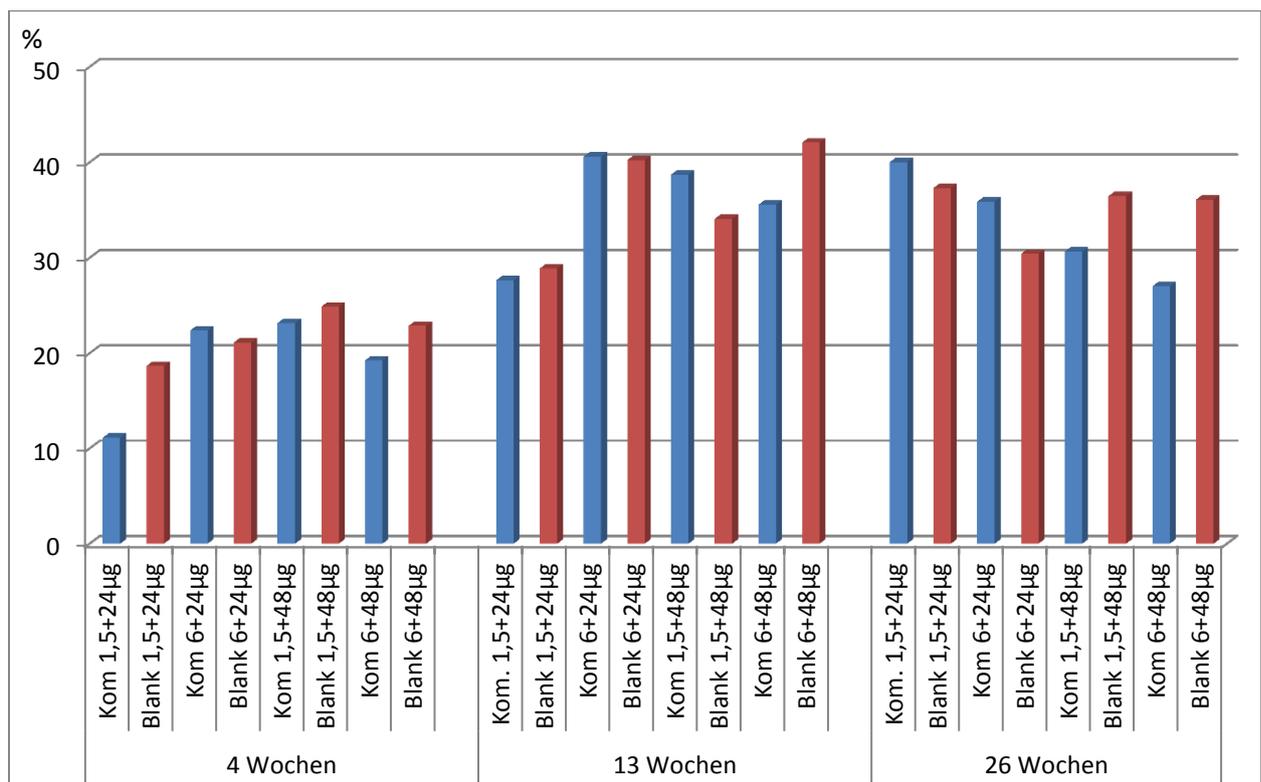


Abbildung 11: Vergleich der Kombinationsgruppen von BMP und VEGF

In der Zusammenfassung der Auswertungszeitpunkte 4 Wochen bis 26 Wochen zeigt der Vergleich der Kombinationsgruppen der Applikationsform *slow release* signifikant mehr Knochengewebe durch Steigerung der VEGF- Konzentration von 1,5 µg auf 6 µg in der Kombination mit 24 µg BMP bzw. durch Steigerung der BMP Konzentration von 24 µg auf 48 µg in der Kombination mit 1,5 µg VEGF (Abb. 12). Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen von VEGF oder BMP konnte keine signifikante Steigerung der Osteoneogenese bewirken.

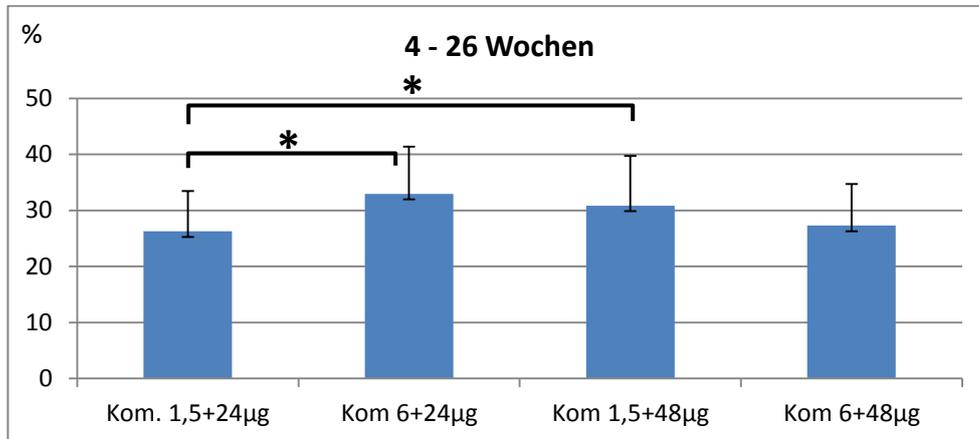


Abbildung 12: Zusammenfassung von Auswertungszeiten der Applikationsform *slow release*, *: Signifikanzniveau $\leq 0,05$

Auch bei der Betrachtung der Kombinationsgruppen zu den verschiedenen Auswertungszeitpunkten der Applikationsform *slow release* war nach 4 und 13 Wochen eine signifikante Verbesserung der Knochenneubildung durch Steigerung der VEGF Konzentration von 1,5 µg auf 6 µg in Kombination mit 24 µg BMP bzw. durch Steigerung der BMP- Konzentration von 24 µg auf 48 µg in Kombination mit 1,5 µg VEGF erkennbar (Abb. 13). Weitere Konzentrationserhöhungen von VEGF und BMP konnten auch hier weder nach 4 noch nach 13 Wochen zu einer signifikanten Steigerung der Knochenregeneration führen. Nach 26 Wochen konnte durch Dosissteigerung keine signifikante Verbesserung der Knochenneubildung erzielt werden (Abb. 13).

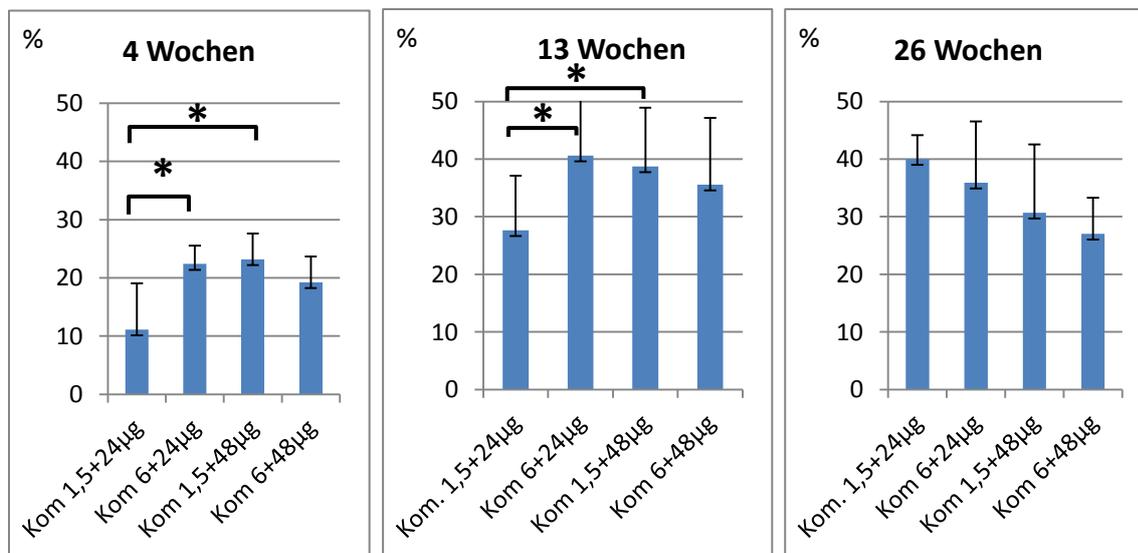


Abbildung 13: Applikationsform *slow release* der Kombinationsgruppen a) nach 4 Wochen, b) nach 13 Wochen, c) nach 26 Wochen, *: Signifikanzniveau $\leq 0,05$

3.5 Vergleich der Kombinationen von BMP und VEGF mit den Einzeldosierungen von BMP in der Applikationsgruppe *slow release*

Der Vergleich der Kombinationsgruppen 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF + 24 µg BMP mit Einzeldosierungen von 24 µg bzw. 48 µg BMP in der Applikationsgruppe *slow release* zeigt (Abb. 14):

Im Vergleich 24µg BMP mit und ohne Zusatz von 1,5 µg VEGF war nach 26 Wochen signifikant mehr Knochengewebe durch den Zusatz von VEGF zu erkennen. Nach 4 Wochen und nach 13 Wochen war der Unterschied noch nicht signifikant.

Durch Steigerung der VEGF- Konzentration von 1,5 µg auf 6µg in der Kombination mit 24 µg BMP konnte im Vergleich zur Einzeldosierung von 24 µg BMP bereits nach 13 Wochen und auch nach 26 Wochen signifikant mehr Knochengewebe gemessen werden. Nach 4 Wochen war dieser Unterschied noch nicht signifikant. Der Vergleich der Kombinationsgruppe 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP mit der doppelten Menge an BMP (48 µg) in Einzeldosierung ergab zu allen Beobachtungszeiträumen keinen signifikanten Unterschied, zeigte also vergleichbare Knochenneubildungsraten. Durch Steigerung der VEGF Konzentration von 1,5 µg auf 6 µg in der Kombination mit 24 µg BMP konnte nach 13 Wochen signifikant mehr Knochengewebe gemessen werden als in der Gruppe mit 48 µg BMP in Einzeldosierung. Die Auswertungszeiträume 4 Wochen und 26 Wochen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

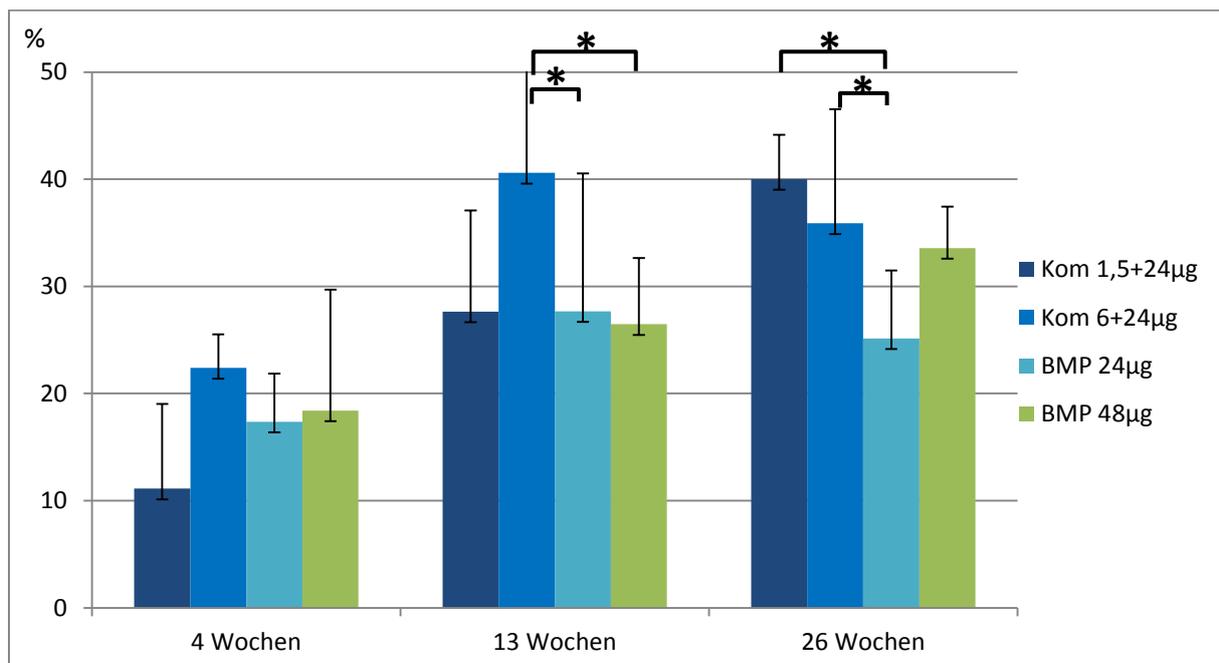


Abbildung 14: Vergleich der Kombination von BMP und VEGF mit den Einzeldosierungen von BMP in der Applikationsgruppe *slow release*, *: Signifikanzniveau $\leq 0,05$

Im Vergleich der Kombinationsgruppe 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF + 48 µg BMP mit 48 µg bzw. 96 µg BMP in Einzeldosierung zeigte die Applikationsgruppe slow release nach 13 Wochen signifikant mehr Osteoneogenese durch den Zusatz von 1,5 µg VEGF in der Kombination mit 48 µg BMP im Vergleich zur Einzeldosierung von 48 µg BMP (Abb. 15). Die anderen Auswertungszeitpunkte zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Knochenneubildung. Der Vergleich der Kombinationsgruppe 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP mit der doppelten Menge an BMP (96 µg) in Einzeldosierung ergab zunächst nach 4 Wochen noch keinen signifikanten Unterschied. Nach 13 Wochen konnte die Kombinationsgruppe 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP signifikant mehr Knochengewebe vorweisen. Nach 26 Wochen zeigte sich signifikant mehr Knochenneubildung in der Gruppe der Einzeldosierung von BMP (96 µg).

In der Langzeitbeobachtung kann somit nach 26 Wochen nur durch die Kombination von VEGF und BMP in niedrigen Konzentrationen (1,5 µg/ 6 µg VEGF + 24 µg BMP) im Vergleich zur doppelten Einzeldosierung von BMP (48 µg) eine Dosisreduktion erzielt werden, ohne dass sich die Knochenneubildungsraten signifikant unterscheiden.

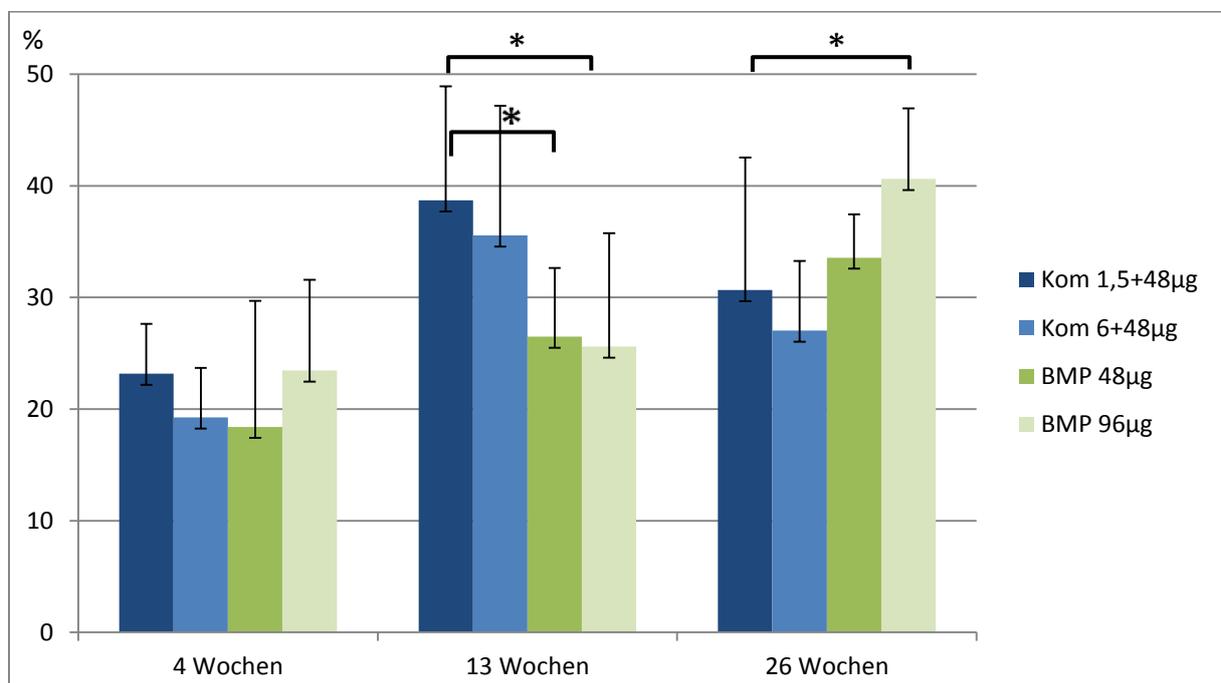


Abbildung 15: Vergleich der Kombination von BMP und VEGF mit den Einzeldosierungen von BMP in der Applikationsgruppe slow release, *: Signifikanzniveau $\leq 0,05$

4. Diskussion

Ein optimaler Knochenersatz sollte den zugrundeliegenden Defekt temporär oder permanent überbrücken und die natürliche Regenerationsfähigkeit des Knochengewebes unterstützen, damit es langfristig zur vollständigen Ausheilung des Knochendefektes kommen kann (Oestern und Probst 1997).

Obwohl sich in den letzten Jahrzehnten umfangreiche Studien mit der Knochenregeneration auseinandergesetzt haben, ist es bisher nicht gelungen, ein ideales Knochenersatzmaterial zu entwickeln, sodass die autogene Transplantation nach wie vor als Goldstandard für die Versorgung von Knochendefekten angesehen werden kann (Samartzis et al. 2005).

Dennoch lässt sich die mit einer autogenen Knochentransplantation vergesellschaftete Morbidität nicht vernachlässigen. In einer Studie aus dem Jahr 2004 konnte gezeigt werden, dass 19,5 % der Patienten nach autologer Knochentransplantation vom Beckenkamm Komplikationen an der Entnahmestelle aufwiesen. 67,2 % der Patienten klagten postoperativ über Hämatome und Serome und sogar 6 % der Patienten zeigten Frakturen im Entnahmegebiet (Pitzen et al. 2004).

Einen anderen Ansatz als den substantiellen Gewebeersatz verfolgt die Unterstützung der physiologischen Knochenheilung durch die Kombination von osteogenen Stammzellen, osteokonduktiven Trägermaterialien und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren in einem Konstrukt. Präklinische Studien konnten bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Knochenneubildung im Tiermodell zeigen (Gothard et al. 2014).

Besonders die Kombination von angiogenen Wachstumsfaktoren (VEGF) und osteogenen Wachstumsfaktoren (BMP) hat in der Vergangenheit einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung angedeutet, wobei bisher unterschiedliche Konzepte über die Technik der Beladung der Trägermaterialien und über die zu verwendenden Konzentrationen der Wachstumsfaktoren vorliegen (Schliephake et al. 2007, Xiao et al. 2011, Zhang et al. 2011, Gothard et al. 2014).

In dieser Studie sollte im Tiermodell untersucht werden, welchen Einfluss die kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF aus PDLLA/CaCO₃-Komposit-Trägermaterialien auf die Knochenregeneration eines *Critical Size Defekts* in vivo ausübt, wobei die Beladung der Trägermaterialien durch CO₂-Hochdruckbegasung erfolgte.

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Tiermodell

Obwohl in Studien bereits bemerkenswerte Fortschritte in der In-Vitro-Forschung von Geweberegeneration erkennbar sind, gibt es dennoch bei dem Bestreben, ein funktionierendes Konzept zum Gewebeersatz für den menschlichen Körper zu entwickeln keine alternativen Verfahren zum Tierversuch, um die Kompliziertheit eines Organismus in die Versuchsanordnung mit einzubeziehen.

Knochenregeneration ist ein komplexer und von verschiedenen ineinandergreifenden Signalwegen abhängiger Prozess, dessen Simulation in vitro nur eingeschränkt möglich ist (Yousefi et al. 2014). So konnten Janicki et al. zeigen, dass die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten in der Zellkultur nicht mit der Fähigkeit der Knochenbildung in-vivo korreliert (Janicki et al. 2011).

Die Vorhersagbarkeit von Ergebnissen aus in vitro Studien für die Einschätzung von Abläufen der Knochenneubildung im lebenden Organismus ist somit nur eingeschränkt möglich (Janicki und Richter 2012).

Besonders bei der Beantwortung der Fragestellung dieser Studie ist es unerlässlich, die Auswirkung auf den lebenden Organismus zu erforschen, um perspektivisch eine geeignete Therapie für den Menschen entwickeln zu können.

Durch die Anwendung von individuellen Tiermodellen ist es möglich, unter standardisierten Bedingungen Biomaterialien zu erforschen, die für die Gewebeerneuerung im Menschen eingesetzt werden können (Khan und Lane 2004).

Besonders für die Untersuchung eines *Critical Size Defects* des Knochengewebes ist es jedoch notwendig, die Auswahl des entsprechenden Versuchstieres sorgfältig zu prüfen.

Ein ideales Tiermodell sollte zu der klinischen Fragestellung passen, die es zu untersuchen gilt (Horner et al. 2010). Da es aktuell keine Versuchstierspezies gibt, die allen Anforderungen zur Simulation des menschlichen Körpers gerecht wird, zeigten Gothard et al. in einer Übersichtsarbeit die Vor- und Nachteile verschiedener Versuchstiere im Hinblick auf spezielle Fragestellungen der knöchernen Geweberegeneration auf (Gothard et al. 2014).

Für die Untersuchung von menschlichen Knochenerkrankungen, gelten Ratten grundsätzlich als allgemein akzeptierte Spezies (Frost und Jee 1992, Gothard et al. 2014).

Für die Durchführung der Versuche in dieser Studie wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die bereits in der Vergangenheit als funktionierendes Tiermodell zur Wirkung von osteogenen Wachstumsfaktoren etabliert werden konnten (Weber et al. 2002, Saito et al. 2003). Letztendlich ist jedoch zu berücksichtigen, dass jedes Tiermodell nur eine Annäherung an die anatomischen, physiologischen und biochemischen Verhältnisse des menschlichen Körpers darstellen kann. Erst die Kombination von verschiedenen Tiermodellen für die jeweiligen Fragestellungen erhöht die Vorhersagbarkeit der Versuchsergebnisse für die Anwendung am Menschen (Horner et al. 2010).

4.1.2 Wachstumsfaktoren

Mit dem zunehmenden Verständnis von Vorgängen der Geweberegeneration sind in der Vergangenheit Signalmoleküle beschrieben worden, die modulierend an der Erneuerung von Gewebedefekten mitwirken können (Urist et al. 1973). Diese, als Wachstumsfaktoren bezeichneten Proteine, wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht und besonders auf dem Gebiet der knöchernen Geweberegeneration sind eine Vielzahl von Faktoren beschrieben worden (Schliephake 2002).

Von Diesen sind die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) die am meisten untersuchten Vertreter für die Erneuerung von Knochengewebe (Giannoudis und Einhorn 2009).

Uneinigkeit herrscht jedoch über die Frage der zu verwendenden Konzentrationen von BMP, die in Versuchsanordnungen überwiegend in viel höheren Dosen verwendet werden, als sie im menschlichen Körper zu finden sind (Tschakaloff et al. 2000).

In Tierstudien kamen BMP Konzentrationen von 5µg bis zu 100mg im Großtierversuch und 0,1µg bis zu 5mg im Kleinterversuch zur Anwendung, was den mangelnden Konsens über die richtige Dosierung der Wachstumsfaktoren besonders verdeutlicht (Gothard et al. 2014).

Neben überwiegend osteoinduktiv wirksamen Wachstumsfaktoren gibt es weitere, die in der Lage sind, die lokale Durchblutungssituation zu verbessern. Für die Versorgung und das Überleben von implantierten Gewebelöcken ist die Angiogenese eine entscheidende Voraussetzung, damit Knochenneubildung entstehen kann, da die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen durch das Gewebe auf eine Strecke von ca. 150- 200 µm begrenzt ist (Goldstein et al. 2001). Die herausragende Bedeutung von VEGF für die Knochenregeneration wird deutlich durch eine Arbeit von Street et al., der durch Inhibierung der VEGF- Aktivität eine gestörte Knochenheilung nachweisen konnte (Street et al. 2002).

VEGF nimmt somit eine zentrale Stellung ein als potenten angiogener Wachstumsfaktor im Rahmen der knöchernen Gewebeneubildung (Axelrad et al. 2007).

Die simultane Freisetzung von osteogenen (BMP) und angiogenen (VEGF) Wachstumsfaktoren kann die natürliche Knochenheilung eines *Critical Size Defekts* am ehesten nachahmen (Xiao et al. 2011).

In mehreren Studien der letzten Jahre bezüglich der Verbesserung der Knochenneubildung durch die kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF werden die Ergebnisse kontrovers diskutiert. So zeigten Kakudo et al. im Tiermodell eine vermehrte ektope Knochenneubildung und Kapillarisation nach 3 Wochen Beobachtungszeit durch die gleichzeitige Abgabe von BMP und VEGF aus einem Kollagen- Hydrogel- Trägermaterial (Kakudo et al. 2006).

Patel et al. konnten zwar orthotop in einem *Critical Size Defect* von Ratten nach 4 Wochen einen vorteilhaften Effekt der kombinierten Freisetzung von BMP und VEGF aus Gelatine- Mikropartikel- Trägermaterialien nachweisen, in der Langzeitbeobachtung nach 12 Wochen war jedoch kein signifikanter Unterschied zur Einzeldosierung von BMP erkennbar (Patel et al. 2008). Young et al. konnten ebenfalls keine Verbesserung der Knochenneubildung in der Langzeitbeobachtung (12 Wochen) durch die simultane Freisetzung von BMP und VEGF aus Gelatine- Mikropartikel- Trägermaterialien in *Critical Size Defects* von Ratten nachweisen (Young et al. 2008). Xiao et al. und Zhang et al. zeigten wiederum eine Verbesserung der Knochenneubildungsrate durch die kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF aus corallinen Trägermaterialien bzw. Seiden- Hydrogelen im Vergleich zur Einzeldosierung von BMP im Tierversuch (Xiao et al. 2011, Zhang et al. 2011).

Schließlich kann jede Studie nur das jeweils zugrundeliegende Versuchsmodell bewerten, ohne eine allgemeingültige Aussage über die Wirksamkeit der simultanen Freisetzung von Wachstumsfaktoren treffen zu können. In zukünftigen Studien sollte jedoch gerade das Gebiet der Wachstumsfaktorkombination untersucht werden, um die Prozesse der Gewebeheilung besser zu verstehen.

4.1.3 Herstellung und Beladung der Implantate mit Wachstumsfaktoren

Für die Beladung eines Knochendefektes sind in den letzten Jahren verschiedene Implantate als Trägermaterialien in Kombination mit verschiedenen Dosierungen von Wachstumsfaktoren verwendet worden. Neben Kollagen, Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat und xenogenen bovinen Materialien sind besonders polyesterbasierte Knochenersatzmaterialien wie Polylactid zur Anwendung gekommen, wobei durch eine konventionelle Beladung mittels Durchtränkung der Träger mit Wachstumsfaktoren nur

kurzfristige Wirkungseffekte erreicht werden konnten (Marukawa et al. 2001, Nagao et al. 2002, Roldan et al. 2004, Arosarena und Collins 2005, Boyne et al. 2006).

In einer Studie von Uludag et al. zur Untersuchung der Auswirkung der Freisetzungskinetik von BMP auf die osteoinduktive Aktivität konnte gezeigt werden, dass durch konventionelle Beladung mittels Durchtränkung 80-90 % der Wirksamkeit innerhalb der ersten 24-48 h verbraucht wurden (Uludag et al. 2000).

Andere Studien konnten dagegen zeigen, dass durch Begasung eingebrachte Wachstumsfaktoren in ein Polylaktid- Trägermaterial zunächst rasch über 9 Tage und anschließend kontinuierlich bis zu 27 Tage freigesetzt werden, so dass nach 4 Wochen noch bis zu 50 % der eingebrachten Wachstumsfaktorkonzentration nachweisbar war (Richardson et al. 2001, Schliephake et al. 2007).

In dieser Studie erfolgte die Beladung der Implantate mit den Wachstumsfaktoren BMP und VEGF ebenfalls durch CO₂-Hochdruckbegasung, wodurch die Gasübergangstemperatur des Polylaktids gesenkt wird und das Polymer sich bei ca. 35 °C verflüssigt. Hierdurch werden die Wachstumsfaktoren im Polymer gelöst und inkorporiert, so dass bei der Degradation in vivo eine langsame Freisetzung erfolgen kann.

Polylaktid- Trägermaterialien haben jedoch den Nachteil, dass bei der Degradation des Materials frei werdende Milchsäure einen kritischen pH- Abfall bewirkt und so eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann, die der Knochenneubildung entgegen wirken würde (Bergsma et al. 1995). Der Zeitpunkt dieses pH- Abfalls wurde in in vitro Studien nach 18- 21 Wochen beobachtet (Schliephake et al. 2007). Durch die Zugabe von Kalziumkarbonat ist es möglich, dem pH- Abfall entgegen zu wirken und die freiwerdende Milchsäure zu neutralisieren. Schliephake et al. konnten 2014 in einer In-Vitro-Untersuchung zeigen, dass durch Begasung inkorporierte Wachstumsfaktoren in Polylaktid- Kalziumkarbonat- Trägermaterialien die Freisetzungskinetik und die Wirksamkeit von osteogenen Wachstumsfaktoren verbessert werden können, bei konstanten pH- Werten zwischen 6,9 und 7,25 während der Degradation des Implantats (Schliephake et al. 2014).

In früheren Untersuchungen konnten bereits günstige Degradationsraten, Biokompatibilität, osteokonduktive Eigenschaften und mechanische Stabilität von Polylaktid- Kalziumkarbonat- Implantaten nachgewiesen werden, sodass nach vollständigem Abbau des Trägermaterials ein kompletter Ersatz durch neugebildeten Knochen angenommen wird (Schiller et al 2004, Eufinger et al. 2007, Backhaus et al. 2013).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse verwendeten wir in dieser Studie ebenfalls Polylaktid- Kalziumkarbonat- Implantate als Trägermaterialien für die kontrollierte Freisetzung der Wachstumsfaktoren BMP und VEGF, um diesen Effekt in vivo zu untersuchen.

Dennoch sollte das Degradationsverhalten in weiteren In- Vivo- Langzeitstudien mit einem Polylaktid- Kalziumkarbonat- Trägermaterial untersucht werden, um die Reaktion des Nachbargewebes während des Abbaus des Implantats noch besser nachzuvollziehen zu können und den Beweis für die Fähigkeit eines vollständigen Ersatzes des Knochendefektes durch neu gebildeten Knochen erbringen zu können.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Vergleich der Einzeldosierungen

Die Untersuchung der verschiedenen Konzentrationen von BMP, jeweils als *slow release* und lokal auf das Implantat appliziert zeigt besonders in der Langzeitbetrachtung nach 26 Wochen die bereits bekannte Dosisabhängigkeit der Osteoneogenese von der BMP Konzentration, jedoch unabhängig von der Applikationsform (Gothard et al. 2014). So ergibt sich in dieser Versuchsanordnung kein Vorteil durch die kontrollierte Freisetzung von BMP in Einzeldosierung gegenüber der lokalen Applikation des Wachstumsfaktors direkt auf das Implantat.

Auch in der Gruppe der Einzeldosierung von VEGF konnte durch die kontrollierte Freisetzung des Wachstumsfaktors in der Langzeitbetrachtung keine Verbesserung der Knochenneubildung im Vergleich zur lokalen Applikation erreicht werden. Die Applikationsform *slow release* zeigt somit keinen Vorteil gegenüber der lokalen Darreichung von VEGF für die Regeneration eines Knochendefekts in dieser Versuchsanordnung.

Der Vergleich beider Applikationsgruppen zeigt insgesamt weniger Knochenneubildung für VEGF in Einzeldosierung als für BMP in Einzeldosierungen, was sich mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien deckt (Patel et al. 2008, Xiao et al 2011).

Die Ergebnisse von Takaoka et al., die eine Verbesserung der Knochenregeneration durch kontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Trägermaterialien beschrieben, konnten wir somit in der Einzeldosierung nicht bestätigen (Takaoka et al. 1991).

4.2.2 Vergleich der Kombinationsdosierungen

Die Kombinationsgruppen von BMP und VEGF zeigen besonders bei den niedrigen Konzentrationen (1,5 µg VEGF + 24 µg BMP) für beide Applikationsformen eine stetige Zunahme der Knochenneubildungsrate bis hin zur 26. Woche, was die Ergebnisse anderer Studien bezüglich des Regenerationsverhaltens von Knochengewebe durch die Stimulation mit angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren bestätigt (Patel et al. 2008).

Nach 26 Wochen wird mehr Knochengewebe in der Gruppe der kontrollierten Freisetzung gebildet, sodass sich für diese Konzentrationsgruppe eine Verbesserung der Osteoneogenese durch den *slow release* der Wachstumsfaktoren ergibt.

Die Betrachtung der kontrollierten Freisetzung zu den verschiedenen Auswertungszeitpunkten anderer Konzentrationskombinationen ergibt zwar zunächst nach 4 Wochen und nach 13 Wochen einen signifikanten Anstieg der Knochenneubildung durch die Konzentrationserhöhungen von jeweils BMP oder VEGF in der Kombination, nach 26 Wochen nimmt die Knochenneubildungsrate jedoch wieder ab.

Anhand dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Dynamik der Knochenneubildung scheint somit die Konzentrationsgruppe 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP in kontrollierter Freisetzung in der Langzeitbeobachtung nach 26 Wochen die Osteoneogenese am besten zu stimulieren.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen von Peng et al., die die Interaktion von VEGF und BMP während der Knochenheilung untersuchten und herausfanden, dass das Verhältnis zwischen VEGF und BMP einen Einfluss auf den synergistischen Effekt der Wachstumsfaktoren ausübt, und dass hohe VEGF Konzentrationen den synergistischen Effekt von VEGF und BMP herabsetzten (Peng et al. 2005).

Auch Hernandez et al. konnten bei der Versorgung von Femurdefekten bei Ratten durch die Kombination von VEGF und BMP in Trägermaterialien einen Vorteil durch niedrige VEGF Konzentration in Kombination mit BMP zeigen (Hernandez et al. 2012).

Berücksichtigt man jedoch, dass in bisherigen tierexperimentellen Studien zur Wirksamkeit der Kombination von Wachstumsfaktoren Konzentrationen für VEGF von 0,2 µg bis 20 µg und für BMP von 0,5 µg bis 120 µg verwendet wurden, wird deutlich, dass jede Konzentrationskombination nur für das jeweilige Tiermodell zu verwenden ist, was die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse erschwert (Gothard et al. 2014).

4.2.3 Vergleich der Kombinationsdosierungen mit den Einzeldosierungen

Der Vergleich der Kombinationsdosierung von BMP und VEGF mit der Einzeldosierung von BMP in der Applikationsgruppe *slow release* zeigt besonders in der Langzeitbeobachtung nach 26 Wochen signifikant mehr Knochengewebe durch den Zusatz von VEGF für die Kombinationsgruppe 1,5 µg VEGF und 24 µg BMP.

Somit kann durch die Zugabe von 1,5 µg VEGF in der Kombination mit 24 µg BMP mehr Knochengewebe nach 26 Wochen erzielt werden, als durch 24 µg BMP in Einzeldosierung. Darüber hinaus war es in dieser Studie möglich durch den Zusatz von 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF zu 24 µg BMP genauso viel Knochengewebe zu messen, wie durch die doppelte Einzeldosierung von BMP (48 µg), also konnte durch die Kombination von BMP und VEGF 50 % der Dosis von BMP eingespart werden, ohne dass sich der neu gebildete Knochen signifikant unterscheidet.

Bei der Betrachtung höherer Kombinationsdosierungen von BMP (1,5 µg VEGF/ 6 µg VEGF + 48 µg BMP) konnten wir zwar einen positiven Effekt durch die Kombination von VEGF und BMP nach 13 Wochen nachweisen, in der Langzeitbeobachtung (26 Wochen) zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Knochenneubildung durch die Kombination von BMP und VEGF im Vergleich zur Einzeldosierung von BMP.

Offensichtlich benötigt der bereits in der Literatur beschriebene synergistische Effekt von BMP und VEGF in der Kombination zumindest in niedrigen Konzentrationen eine Latenzzeit, um die positive Wirkung zu entfalten.

Diese Vermutung könnte auch erklären, warum in den Studien von Patel et al. und Young et al. nach 13 Wochen keine Verbesserung bezüglich der Knochenneubildung durch die Kombination von BMP und VEGF im Vergleich zur Einzeldosierung von BMP zu erkennen war (Patel et al. 2008, Young et al. 2008).

Abschließend lässt sich also feststellen, dass zumindest für die niedrigen Kombinationsdosierungen durch kontrollierter Freisetzung der in der Literatur bekannte synergistische Effekt von BMP und VEGF in diesem Tiermodell bestätigt werden konnte (Peng et al. 2005, Xiao et al. 2011, Zhang et al. 2011, Hernandez et al. 2012).

Außerdem konnten die Ergebnisse dieser Studie die Kombinationsdosierung 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP in kontrollierter Freisetzung besonders im Hinblick auf die Langzeitbeobachtung nach 26 Wochen als effizienteste Konzentration herausarbeiten, ohne dass Kompromisse bei der Knochenneubildungsrate eingegangen werden müssen. Eine Dosisreduktion der BMP Konzentration ist bei der Verwendung von niedrigen BMP und VEGF Kombinationskonzentrationen somit möglich.

Einen Vorteil der kontrollierten Freisetzung (*slow release*) gegenüber der konventionellen lokalen Applikation der Wachstumsfaktoren konnten wir in der Langzeitbetrachtung dieser Studie nur in den Konzentrationskombination 1,5µg bzw. 6µg VEGF + 24µg BMP nachweisen. Bei der Betrachtung der übrigen Kombinationsdosierungen und der Einzeldosierungen konnte diese Studie keinen Vorteil durch die kontrollierte Freisetzung nachweisen.

4.3 Ausblick

Die regenerative Medizin ist ein sich ständig weiterentwickelndes Gebiet, dessen Ergebnisse sich aus verschiedenen Schwerpunktbereichen der Forschung wie der Biotechnik, der Biomechanik, der Materialkunde und der Zellbiologie zusammensetzen. Durch eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre konnten einige Materialien entwickelt werden, die heute erfolgreich im klinischen Alltag eingesetzt werden, wobei die Kosten- Nutzen- Überlegung bei der Betrachtung von Hilfsmitteln zur Unterstützung der Knochenregeneration in Zukunft immer wichtiger werden wird (Hollister und Murphy 2011, Amini et al. 2012, Turner et al. 2013). Die Ergebnisse von In-Vitro-Untersuchungen besonders im Bereich des Tissue Engineering, eines Wissenschaftsgebietes, das biologische, physikalische und biotechnische Aspekte in sich vereint, können eine wichtige Grundlage zum Verständnis isolierter Prozesse und Mechanismen der Geweberegeneration liefern. Dennoch werden sich diese Ergebnisse nicht unmittelbar auf den erfolgreichen Einsatz im lebenden Organismus übertragen lassen (Janicki et al. 2011).

Gerade durch die Anwendung von Tiermodellen mit selektiven Wachstumsfaktoren ist es möglich, mehr Erkenntnisse über die klinische Anwendung von Strategien für den knöchernen Gewebeersatz zu erlangen. Die Limitationen, die sich aus einer zeitlich und räumlich begrenzten Applikation von Wachstumsfaktoren auf ein Trägermaterial ergeben, können durch In-Vivo-Studien besser verstanden und eingegrenzt werden. Die kombinierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren stellt dabei einen vielversprechenden Ansatz dar, wobei die Interaktionen der einzelnen Faktoren untereinander noch immer nicht vollständig aufgeklärt sind (Turner et al. 2013, Gothard et al. 2014).

Auch die Ergebnisse dieser Studie können helfen, Abläufe der Geweberegeneration durch kontrollierte und kombinierte Stimulation besser zu verstehen. Angesichts einer noch geringen Anzahl von Studien zur kontrollierten simultanen Freisetzung von Wachstumsfaktoren sollte die Freisetzungskinetik von Faktorkombinationen aus Trägermaterialien besonders in der Langzeitbeobachtung weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie mit dem Titel „Knochenregeneration in vivo durch kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF aus PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds“ war eine Verbesserung der Knochenregeneration von Mandibuladefekten durch die kombinierte Freisetzung der osteoinduktiven Proteine BMP und VEGF aus PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds.

Hierzu wurden PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds mit Konzentrationen von 24 µg, 48 µg und 96 µg BMP sowie 0,24 µg, 1,5 µg und 6 µg VEGF jeweils kombiniert und in Einzeldosierung beladen und in *Critical Size Defekte* der Mandibula von adulten Ratten implantiert. Nach den Beobachtungszeiträumen 4 Wochen, 12 Wochen und 26 Wochen erfolgten die histologischen Untersuchungen. Durch computergestützte Histomorphometrie wurde der neugebildete Knochenanteil bestimmt und die Ergebnisse mittels Varianzanalyse (ANOVA) statistisch überprüft. Im Vergleich zu der Einzeldosierung von BMP konnte durch die Kombination von 24 µg BMP und 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF besonders in der Langzeitbeobachtung eine vermehrte Knochenregeneration erzielt werden ($p < 0,05$). Zusätzlich konnten vergleichbare Knochenneubildungen durch die Kombination von 24 µg BMP und 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF nach 4, 12 und 26 Wochen nachgewiesen werden, wie durch 48 µg BMP in Einzeldosierung. Durch die kombinierte Freisetzung von BMP und VEGF aus PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds konnte die Knochenneubildung im Vergleich zur Einzeldosierung signifikant gesteigert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von VEGF die applizierten Konzentrationen von BMP reduziert werden können, ohne dass es zu einer Verringerung der Knochenneubildungsrate kommt.

6. Literaturverzeichnis

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012):

Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 5, 363-408

Arosarena O, Collins W (2005):

Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 592-597

Axelrad TW, Kakar S, Einhorn TA (2007):

New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* 38, 49-62

Backhaus S, Annen T, Epple M (2013):

A porous pH-stabilized compositematerial consisting of poly (D, L-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution. *Mat-wiss u Werksttech* 44, 107-111

Bauer TW, Muschler GF (2000):

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

Bendix D, Liedtke H:

Resorbierbare Polymere: Zusammensetzung, Eigenschaften und Anwendungen . In: Biodegradierbare Implantate und Materialien, Heft zu „Der Unfallchirurg“, Herausgeber: Claes L, Ignatius A, Springer Verlag, Heidelberg 2006

Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G (1995):

Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 16, 25-31

Boyne PJ, Salina S, Nakamura A, Audia F, Shabahang S (2006):

Bone regeneration using rhBMP-2 induction in hemimandibulectomy type defects of elderly sub-human primates. *Cell Tissue Bank* 7, 1-10

Burg KJ, Porter S, Kellam JF (2000):

Biomaterial developments for bone tissue engineering. *J Biomaterials* 23, 2347-2359

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH (2005):

Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9, 777-794

Daculsi G, LeGeros RZ, Heughebaert M, Barbieux I (1990):

Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int* 1, 20-27

De Boer HH (1988):

The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 226, 292-298

Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW (2000):

Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 5, 1667-1674

Dimitriou R, Dahabreh Z, Katsoulis E, Matthews SJ, Branfoot T, Giannoudis PV (2005): Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions. *Injury* 4, 51-59

Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P (2003): Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 4, 622-629

Drake CJ, Wessels A, Trusk T, Little CD (2006): Elevated vascular endothelial cell growth factor affects mesocardial morphogenesis and inhibits normal heart bending. *Dev Dyn* 1, 10-18

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

Eufinger H, Rasche C, Lehmbrock J, Wehmöller M, Weihe S, Schmitz I, Schiller C, Epple M (2007): Performance of functionally graded implants of polylactides and calcium phosphate/calcium carbonate in an ovine model for computer assisted craniectomy and cranioplasty. *Biomaterials* 3, 475-485

Even J, Eskander M, Kang J (2012): Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg* 20, 547-552

Filion TM, Song J: Scalable Functional Bone Substitutes: Strategic Integration of Key Structural Elements of Bone in Synthetic Biomaterials, INTECH Open Access Publisher, 2011

Finkemeier CG (2002): Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84, 454-464

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 3, 227-236

Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA (1995): Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1, 1-8

Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W (2007): VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* 41, 516-522

Ghosh SK, Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Roy SK, Basu D (2008): In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 1, 217-227

Giannoudis PV, Einhorn TA (2009):

Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40, 1-3

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

Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG (2001):

Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 11, 1279-1288

Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM, Oreffo RO (2014):

Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 28, 166-207

Habibovic P, de Groot K (2007):

Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 25-32

Hench LL, Wilson J (1984):

Surface-active biomaterials. *Science* 4675, 630-636

Herford AS, Lu M, Akin L, Cicciù M (2012):

Evaluation of a porcine matrix with and without platelet-derived growth factor for bone graft coverage in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 6, 1351-1358

Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Évora M, Delgado A, Evora C (2012):

In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res A* 100, 2382-2391

Hidalgo DA (1991):

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

Hirata E, Ménard-Moyon C, Venturelli E, Takita H, Watari F, Bianco A, Yokoyama A (2013):

Carbon nanotubes functionalized with fibroblast growth factor accelerate proliferation of bone marrow-derived stromal cells and bone formation. *Nanotechnology* 43, 1-9

Hollister SJ, Murphy WL (2011):

Scaffold translation: barriers between concept and clinic. *Tissue Eng Part B Rev* 6, 459-474

Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, Yang XB (2010):

Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng* 16, 263-271

Janicki P, Richter W (2012):

Neue Ansätze für die in situ Regeneration und das Tissue Engineering von Knochen. *Dtsch Z Sportmed* 63, 30-35

Janicki P, Boeuf S, Steck E, Egermann M, Kasten P, Richter W (2011):

Prediction of in vivo bone forming potency of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 21, 488-507

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

Junqueira L C:

Histologie. 6. Auflage, Springer Medizinverlag, Heidelberg 2005

Kakudo N, Kusumoto K, Wang YB, Iguchi Y, Ogawa Y (2006):

Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life Sci* 19, 1847-1855

Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Nopguchi T, Kanatani I, Ogawa O, Tabata Y (2004):

Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials* 25, 4513-4520

Khan SN, Lane JM (2004):

Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. *Biomaterials* 25, 1475-1485

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

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

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

Li G, Cui Y, McIlmurray L, Allen WE, Wang H (2005):

rhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells. *J Orthop Res* 3, 680-685

Liu J, Xu Z, Li D, Xu S (2006):

Mechanical properties and biocompatibility of nanometer calcium carbonate/poly (L-lactide) composites. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 4, 805-808

Lüllmann- Rauch R:

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

Macewen W (1881):

Observations concerning transplantation on bone. *Proc R Soc Lond* 32, 232

Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam MI, Enomoto S (2001):

Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. *Br J Oral Maxillofac Surg* 39, 452-459

Middleton JC, Tipton AJ (2000):

Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 23, 2335-2346

Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M (1999):

Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 3, 232-237

Nagao H, Tachikawa N, Miki T, Oda M, Mori M, Takahashi K, Enomoto S (2002):

Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 66-72

Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D (2010):

Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 132, 15-30

Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K (2000):

Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 4, 621-630

Oestern H- J, Probst J:

Unfallchirurgie in Deutschland. 1. Auflage, Springer, Heidelberg 1997

Ollier L:

Traité expérimental et clinique de la régénération des os de la production artificielle du tissu osseux. Victor Masson et fils, Paris 1867 S.36

Ornitz DM, Itoh N (2001):

Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 3, 1-12

Pang EK, Im SU, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Han SB, Cho KS (2004):

Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 10, 1364-1370

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008):

Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 43, 931-940

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005):

VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 2017-2027

Pitzen T, Kränzlein K, Steudel WI, Strowitzki M (2004):

Complaints and findings at the iliac crest donor site following anterior cervical fusion. *Zentralbl Neurochir* 1, 7-12

Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001):

Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nature Biotechnol* 19, 1029-1034

Ripamonti U, Ferretti C, Teare J, Blann L (2009):

Transforming growth factor-beta isoforms and the induction of bone formation: implications for reconstructive craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 20, 1544-1555

Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açil Y, Terheyden H (2004):

Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. Bone morphogenetic protein-7. *Bone* 34, 80-90

Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami N, Nawata M, Kojima S, Nozaki K, Takaoka K (2003):

Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* 4, 381-386

Samartzis D, Shen FH, Goldberg EJ, An HS (2005):

Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? *Spine (Phila Pa 1976)* 15, 1756-1761

Santos MH, Valerio P, Goes AM, Leite MF, Heneine LG, Mansur HS (2007):

Biocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites doped with Zn²⁺. *Biomed Mater* 2, 135-141

Schiller C, Rasche C, Wehmöller M, Beckmann F, Eufinger H, Epple M (2004):

Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/ calcium carbonate. *Biomaterials* 25, 1239-1247

Schliephake H (2002):

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

Schliephake H, Weich HA, Schulz J, Gruber R (2007):

In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *Biomed Mater Res* 83, 455-462

Schliephake H, Vucak M, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M (2014):

Solvent free production of porous PDLLA/calcium carbonate composite scaffolds improves the release of bone growth factors. *Oral Maxillofac Surg*. 2014 Sep 3. [Epub ahead of print]

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

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

Smith LG, Karagianes MT (1974):

Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcif. Tissue Res* 4, 333-337

Speckmann E- J:

Physiologie. 5. Auflage; Urban& Fischer, München 2008

Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002):

Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A 15, 9656-9661

Takaoka K, Koezuka H, Nakahara H (1991):

Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. J Orthop Res 9, 902-907

Torroni A (2009):

Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art. J Oral Maxillofac Surg. 5, 1121-1127

Tschakaloff A, Von Oepen R, Seibt S, Vieting M (1996):

Das Begasungsverfahren zur Beladung resorbierbarer Polymere mit thermolabilen Substanzen. Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 20, 47-50

Tschakaloff A, Schliephake H, Dard M (2000) :

Pilotstudie zur kontrollierten Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Polylaktidkörpern. Mund Kiefer GesichtsChir 4, 474-478

Turner NJ, Keane TJ, Badylak SF (2013):

Lessons from developmental biology for regenerative medicine. Birth Defects Res C Embryo Today 3, 149-159

Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM (2000):

Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: a correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. J Biomed Mater Res 50, 227-238

Urist MR (1997):

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

Urist MR, Silvermann BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967):

The bone induction principle. Clin Orthop Rel Res 53, 243

Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C (1973):

Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Natl Acad Sci U S A 12, 3511-3515

Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U (2002):

Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant Escherichia coli. J Biotechnol 2, 185-194

Van Leeuwenhoek A (1674):

Microscopical observations about blood, milk, bones, the brain, spittle, cuticula, sweat, fat and tears. *Philos Trans R Soc Lond* 9, 121-131

Van Meekeren J:

Heel-en geneeskonstige aanmerkingen. Commelijjn, Amsterdam (1668)

Walter Ph v (1821):

Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. *J Chir Augenheilk* 2, 571

Weber FE, Eyrich G, Gratz KW, Maly FE, Sailer HF (2002):

Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1, 60-65

Welsch U:

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

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* 12, 1286-1291

Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, Hou H, Tang T, Fan X (2011):

Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced Bone regeneration. *Biomed Mater* 6, 15013

Yates DM, Brockhoff HC, Finn R, Phillips C (2013):

Comparison of intraoral harvest sites for corticocancellous bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 3, 497-504

Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M, Mikos AG (2008):

Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A* 9, 2347-2362

Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RG, Uth N (2014):

Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review. *J Biomed Mater Res* 10, 1-22

Zhang W, Wang X, Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, Zeng D, Chen J, Zhang Z, Kaplan DL, Jiang X (2011):

The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF(165) and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials* 35, 9415-9424

7. Anhang

7.1 Statistische Analyse nach 4 Wochen, Applikation: *slow release*

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	ID
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Aplication	2	control slow release
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	24
Columns in Z Per Subject	1
Subjects	42
Max Obs Per Subject	2

Number of Observations	
Number of Observations Read	84
Number of Observations Used	84
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates					
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Intercept	ID	4.6536	8.1452	0.57	0.2839
Residual		43.3091	10.3528	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	494.3
AIC (smaller is better)	498.3
AICC (smaller is better)	498.5
BIC (smaller is better)	501.8

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Application	1	35	0.30	0.5871
Med	6	35	5.76	0.0003
Application*Med	6	35	1.73	0.1429

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	24.8227	2.0940	35	11.85	<.0001	0.05	20.5717	29.0737
Med	BMP 48µg	33.6255	2.0940	35	16.06	<.0001	0.05	29.3746	37.8765
Med	BMP 96µg	40.2744	2.0940	35	19.23	<.0001	0.05	36.0234	44.5254
Med	Kom.1,5+24µg	38.6638	2.0940	35	18.46	<.0001	0.05	34.4128	42.9148
Med	Kom.1,5+48µg	33.5697	2.0940	35	16.03	<.0001	0.05	29.3187	37.8207
Med	Kom.6+24µg	33.1533	2.0940	35	15.83	<.0001	0.05	28.9023	37.4042
Med	Kom.6+48µg	31.5661	2.0940	35	15.07	<.0001	0.05	27.3151	35.8171

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	-8.8029	2.9613	35	-2.97	0.0053	0.05	-14.8147	-2.7911
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-15.4517	2.9613	35	-5.22	<.0001	0.05	-21.4635	-9.4399
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	-13.8411	2.9613	35	-4.67	<.0001	0.05	-19.8529	-7.8293
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-8.7470	2.9613	35	-2.95	0.0056	0.05	-14.7588	-2.7352
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-8.3306	2.9613	35	-2.81	0.0080	0.05	-14.3424	-2.3188
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-6.7434	2.9613	35	-2.28	0.0290	0.05	-12.7552	-0.7316
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-6.6488	2.9613	35	-2.25	0.0312	0.05	-12.6606	-0.6371
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-5.0383	2.9613	35	-1.70	0.0977	0.05	-11.0500	0.9735
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	0.05584	2.9613	35	0.02	0.9851	0.05	-5.9560	6.0676
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	0.4723	2.9613	35	0.16	0.8742	0.05	-5.5395	6.4841
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	2.0594	2.9613	35	0.70	0.4914	0.05	-3.9524	8.0712
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	1.6106	2.9613	35	0.54	0.5900	0.05	-4.4012	7.6224
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	6.7047	2.9613	35	2.26	0.0299	0.05	0.6929	12.7165
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	7.1211	2.9613	35	2.40	0.0216	0.05	1.1094	13.1329
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	8.7083	2.9613	35	2.94	0.0058	0.05	2.6965	14.7201
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	5.0941	2.9613	35	1.72	0.0942	0.05	-0.9177	11.1059
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	5.5106	2.9613	35	1.86	0.0712	0.05	-0.5012	11.5223
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	7.0977	2.9613	35	2.40	0.0220	0.05	1.0859	13.1095
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	0.4165	2.9613	35	0.14	0.8890	0.05	-5.5953	6.4282
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	2.0036	2.9613	35	0.68	0.5031	0.05	-4.0082	8.0154
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	1.5871	2.9613	35	0.54	0.5954	0.05	-4.4246	7.5989

7.2 Statistische Analyse nach 12 Wochen, Applikation: *slow release*

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg
Time	1	12 weeks

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	8
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	42

Number of Observations	
Number of Observations Read	42
Number of Observations Used	42
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates				
Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	106.85	25.5425	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	275.4
AIC (smaller is better)	277.4
AICC (smaller is better)	277.5
BIC (smaller is better)	278.9

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Med	6	35	2.25	0.0614

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	27.6761	4.2200	35	6.56	<.0001	0.05	19.1090	36.2432
Med	BMP 48µg	26.4804	4.2200	35	6.27	<.0001	0.05	17.9133	35.0475
Med	BMP 96µg	25.6109	4.2200	35	6.07	<.0001	0.05	17.0438	34.1780
Med	Kom.1,5+24µg	27.6499	4.2200	35	6.55	<.0001	0.05	19.0828	36.2171
Med	Kom.1,5+48µg	38.7120	4.2200	35	9.17	<.0001	0.05	30.1449	47.2792
Med	Kom.6+24µg	40.5931	4.2200	35	9.62	<.0001	0.05	32.0260	49.1602
Med	Kom.6+48µg	35.5647	4.2200	35	8.43	<.0001	0.05	26.9976	44.1318

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	1.1957	5.9680	35	0.20	0.8424	0.05	-10.9201	13.3114
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	2.0652	5.9680	35	0.35	0.7314	0.05	-10.0506	14.1809
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	0.02614	5.9680	35	0.00	0.9965	0.05	-12.0896	12.1419
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-11.0360	5.9680	35	-1.85	0.0729	0.05	-23.1517	1.0798
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-12.9170	5.9680	35	-2.16	0.0373	0.05	-25.0327	-0.8013
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-7.8886	5.9680	35	-1.32	0.1948	0.05	-20.0044	4.2271
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	0.8695	5.9680	35	0.15	0.8850	0.05	-11.2462	12.9852
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-1.1695	5.9680	35	-0.20	0.8458	0.05	-13.2853	10.9462
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	-12.2316	5.9680	35	-2.05	0.0480	0.05	-24.3474	-0.1159
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-14.1127	5.9680	35	-2.36	0.0237	0.05	-26.2284	-1.9969
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	-9.0843	5.9680	35	-1.52	0.1370	0.05	-21.2000	3.0314
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	-2.0390	5.9680	35	-0.34	0.7347	0.05	-14.1547	10.0767
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	-13.1011	5.9680	35	-2.20	0.0349	0.05	-25.2169	-0.9854
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	-14.9822	5.9680	35	-2.51	0.0168	0.05	-27.0979	-2.8664
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	-9.9538	5.9680	35	-1.67	0.1043	0.05	-22.0695	2.1619
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	-11.0621	5.9680	35	-1.85	0.0722	0.05	-23.1778	1.0536
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	-12.9431	5.9680	35	-2.17	0.0370	0.05	-25.0589	-0.8274
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	-7.9148	5.9680	35	-1.33	0.1934	0.05	-20.0305	4.2009
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	-1.8810	5.9680	35	-0.32	0.7545	0.05	-13.9968	10.2347
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	3.1473	5.9680	35	0.53	0.6013	0.05	-8.9684	15.2631
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	5.0284	5.9680	35	0.84	0.4052	0.05	-7.0874	17.1441

7.3 Statistische Analyse nach 26 Wochen, Applikation: *slow release*

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg
Time	1	26 weeks

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	8
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	42

Number of Observations	
Number of Observations Read	42
Number of Observations Used	42
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates				
Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	53.0493	12.6812	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	250.9
AIC (smaller is better)	252.9
AICC (smaller is better)	253.0
BIC (smaller is better)	254.4

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Med	6	35	4.11	0.0032

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	25.1449	2.9735	35	8.46	<.0001	0.05	19.1084	31.1813
Med	BMP 48µg	33.5724	2.9735	35	11.29	<.0001	0.05	27.5359	39.6088
Med	BMP 96µg	40.6108	2.9735	35	13.66	<.0001	0.05	34.5744	46.6473
Med	Kom.1,5+24µg	40.0151	2.9735	35	13.46	<.0001	0.05	33.9786	46.0516
Med	Kom.1,5+48µg	30.6673	2.9735	35	10.31	<.0001	0.05	24.6308	36.7038
Med	Kom.6+24µg	35.8859	2.9735	35	12.07	<.0001	0.05	29.8494	41.9224
Med	Kom.6+48µg	27.0245	2.9735	35	9.09	<.0001	0.05	20.9881	33.0610

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	-8.4275	4.2051	35	-2.00	0.0528	0.05	-16.9644	0.1094
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-15.4660	4.2051	35	-3.68	0.0008	0.05	-24.0028	-6.9291
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	-14.8702	4.2051	35	-3.54	0.0012	0.05	-23.4071	-6.3334
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-5.5224	4.2051	35	-1.31	0.1976	0.05	-14.0593	3.0145
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-10.7411	4.2051	35	-2.55	0.0151	0.05	-19.2779	-2.2042
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-1.8797	4.2051	35	-0.45	0.6576	0.05	-10.4166	6.6572
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-7.0385	4.2051	35	-1.67	0.1031	0.05	-15.5753	1.4984
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-6.4427	4.2051	35	-1.53	0.1345	0.05	-14.9796	2.0941
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	2.9051	4.2051	35	0.69	0.4942	0.05	-5.6318	11.4420
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-2.3135	4.2051	35	-0.55	0.5857	0.05	-10.8504	6.2233
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	6.5478	4.2051	35	1.56	0.1284	0.05	-1.9890	15.0847
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	0.5957	4.2051	35	0.14	0.8882	0.05	-7.9411	9.1326
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	9.9436	4.2051	35	2.36	0.0237	0.05	1.4067	18.4804
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	4.7249	4.2051	35	1.12	0.2688	0.05	-3.8119	13.2618
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	13.5863	4.2051	35	3.23	0.0027	0.05	5.0494	22.1232
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	9.3478	4.2051	35	2.22	0.0328	0.05	0.8110	17.8847
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	4.1292	4.2051	35	0.98	0.3329	0.05	-4.4077	12.6661
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	12.9906	4.2051	35	3.09	0.0039	0.05	4.4537	21.5274
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	-5.2186	4.2051	35	-1.24	0.2229	0.05	-13.7555	3.3182
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	3.6427	4.2051	35	0.87	0.3922	0.05	-4.8941	12.1796
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	8.8614	4.2051	35	2.11	0.0423	0.05	0.3245	17.3982

7.4 Statistische Analyse alle Zeitpunkte gemittelt, Applikation: *slow release*

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg
Time	3	12 weeks 26 weeks 4 weeks

Dimensions	
Covariance Parameters	1
Columns in X	32
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	126

Number of Observations	
Number of Observations Read	126
Number of Observations Used	126
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates				
Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	66.3672	9.1595	7.25	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	776.1
AIC (smaller is better)	778.1
AICC (smaller is better)	778.1
BIC (smaller is better)	780.8

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Med	6	105	2.91	0.0116
Time	2	105	37.14	<.0001
Med*Time	12	105	2.85	0.0020

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	23.3987	1.9202	105	12.19	<.0001	0.05	19.5913	27.2060
Med	BMP 48µg	26.1547	1.9202	105	13.62	<.0001	0.05	22.3474	29.9621
Med	BMP 96µg	29.8952	1.9202	105	15.57	<.0001	0.05	26.0878	33.7025
Med	Kom.1,5+24µg	26.2659	1.9202	105	13.68	<.0001	0.05	22.4586	30.0733
Med	Kom.1,5+48µg	30.8497	1.9202	105	16.07	<.0001	0.05	27.0424	34.6571
Med	Kom.6+24µg	32.9544	1.9202	105	17.16	<.0001	0.05	29.1470	36.7617
Med	Kom.6+48µg	27.2793	1.9202	105	14.21	<.0001	0.05	23.4720	31.0867

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	-2.7561	2.7155	105	-1.01	0.3125	0.05	-8.1405	2.6284
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-6.4965	2.7155	105	-2.39	0.0185	0.05	-11.8809	-1.1121
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	-2.8673	2.7155	105	-1.06	0.2935	0.05	-8.2517	2.5171
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-7.4511	2.7155	105	-2.74	0.0071	0.05	-12.8355	-2.0667
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-9.5557	2.7155	105	-3.52	0.0006	0.05	-14.9401	-4.1713
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-3.8807	2.7155	105	-1.43	0.1560	0.05	-9.2651	1.5037
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-3.7404	2.7155	105	-1.38	0.1713	0.05	-9.1248	1.6440
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-0.1112	2.7155	105	-0.04	0.9674	0.05	-5.4956	5.2732
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	-4.6950	2.7155	105	-1.73	0.0868	0.05	-10.0794	0.6894
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-6.7997	2.7155	105	-2.50	0.0138	0.05	-12.1841	-1.4152
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	-1.1246	2.7155	105	-0.41	0.6796	0.05	-6.5090	4.2598
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	3.6292	2.7155	105	1.34	0.1843	0.05	-1.7552	9.0136
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	-0.9546	2.7155	105	-0.35	0.7259	0.05	-6.3390	4.4298
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	-3.0592	2.7155	105	-1.13	0.2625	0.05	-8.4436	2.3252
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	2.6158	2.7155	105	0.96	0.3376	0.05	-2.7686	8.0002
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	-4.5838	2.7155	105	-1.69	0.0944	0.05	-9.9682	0.8006
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	-6.6885	2.7155	105	-2.46	0.0154	0.05	-12.0729	-1.3040
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	-1.0134	2.7155	105	-0.37	0.7098	0.05	-6.3978	4.3710
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	-2.1046	2.7155	105	-0.78	0.4401	0.05	-7.4891	3.2798
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	3.5704	2.7155	105	1.31	0.1914	0.05	-1.8140	8.9548
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	5.6751	2.7155	105	2.09	0.0390	0.05	0.2906	11.0595

7.5 Statistische Analyse nach 4 Wochen, Applikation: *slow release* und lokal

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	ID
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Aplication	2	control slow release
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	24
Columns in Z Per Subject	1
Subjects	42
Max Obs Per Subject	2

Number of Observations	
Number of Observations Read	84
Number of Observations Used	84
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates					
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Intercept	ID	9.1312	6.9903	1.31	0.0957
Residual		31.2035	7.4591	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	480.7
AIC (smaller is better)	484.7
AICC (smaller is better)	484.9
BIC (smaller is better)	488.2

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Application	1	35	1.02	0.3195
Med	6	35	3.16	0.0138
Application*Med	6	35	1.21	0.3266

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24 μ g	17.2884	2.0303	35	8.52	<.0001	0.05	13.1667	21.4102
Med	BMP 48 μ g	16.7395	2.0303	35	8.24	<.0001	0.05	12.6178	20.8612
Med	BMP 96 μ g	23.7171	2.0303	35	11.68	<.0001	0.05	19.5954	27.8389
Med	Kom.1,5+24 μ g	14.8966	2.0303	35	7.34	<.0001	0.05	10.7748	19.0183
Med	Kom.1,5+48 μ g	24.0294	2.0303	35	11.84	<.0001	0.05	19.9076	28.1511
Med	Kom.6+24 μ g	21.7590	2.0303	35	10.72	<.0001	0.05	17.6372	25.8807
Med	Kom.6+48 μ g	21.0642	2.0303	35	10.37	<.0001	0.05	16.9425	25.1860

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	0.5489	2.8713	35	0.19	0.8495	0.05	-5.2801	6.3779
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-6.4287	2.8713	35	-2.24	0.0316	0.05	-12.2578	-0.5997
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	2.3918	2.8713	35	0.83	0.4105	0.05	-3.4372	8.2208
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-6.7410	2.8713	35	-2.35	0.0247	0.05	-12.5700	-0.9119
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-4.4706	2.8713	35	-1.56	0.1285	0.05	-10.2996	1.3584
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-3.7758	2.8713	35	-1.32	0.1971	0.05	-9.6049	2.0532
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-6.9776	2.8713	35	-2.43	0.0204	0.05	-12.8067	-1.1486
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	1.8429	2.8713	35	0.64	0.5252	0.05	-3.9861	7.6719
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	-7.2899	2.8713	35	-2.54	0.0157	0.05	-13.1189	-1.4608
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-5.0195	2.8713	35	-1.75	0.0892	0.05	-10.8485	0.8095
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	-4.3247	2.8713	35	-1.51	0.1410	0.05	-10.1538	1.5043
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	8.8205	2.8713	35	3.07	0.0041	0.05	2.9915	14.6496
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	-0.3123	2.8713	35	-0.11	0.9140	0.05	-6.1413	5.5168
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	1.9581	2.8713	35	0.68	0.4997	0.05	-3.8709	7.7872
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	2.6529	2.8713	35	0.92	0.3618	0.05	-3.1761	8.4819
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	-9.1328	2.8713	35	-3.18	0.0031	0.05	-14.9618	-3.3038
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	-6.8624	2.8713	35	-2.39	0.0224	0.05	-12.6914	-1.0334
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	-6.1676	2.8713	35	-2.15	0.0387	0.05	-11.9967	-0.3386
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	2.2704	2.8713	35	0.79	0.4344	0.05	-3.5587	8.0994
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	2.9651	2.8713	35	1.03	0.3088	0.05	-2.8639	8.7942
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	0.6948	2.8713	35	0.24	0.8102	0.05	-5.1343	6.5238

7.6 Statistische Analyse nach 12 Wochen, Applikation: *slow release* und lokal

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	ID
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Aplication	2	control slow release
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	24
Columns in Z Per Subject	1
Subjects	42
Max Obs Per Subject	2

Number of Observations	
Number of Observations Read	84
Number of Observations Used	84
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates					
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Intercept	ID	18.8765	15.6249	1.21	0.1135
Residual		71.6139	17.1190	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	537.5
AIC (smaller is better)	541.5
AICC (smaller is better)	541.7
BIC (smaller is better)	545.0

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Application	1	35	4.24	0.0470
Med	6	35	2.73	0.0276
Application*Med	6	35	1.52	0.2019

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	31.2665	3.0189	35	10.36	<.0001	0.05	25.1378	37.3953
Med	BMP 48µg	27.8475	3.0189	35	9.22	<.0001	0.05	21.7187	33.9762
Med	BMP 96µg	32.5705	3.0189	35	10.79	<.0001	0.05	26.4418	38.6993
Med	Kom.1,5+24µg	28.2726	3.0189	35	9.37	<.0001	0.05	22.1439	34.4013
Med	Kom.1,5+48µg	36.3996	3.0189	35	12.06	<.0001	0.05	30.2709	42.5284
Med	Kom.6+24µg	40.4175	3.0189	35	13.39	<.0001	0.05	34.2887	46.5462
Med	Kom.6+48µg	38.8203	3.0189	35	12.86	<.0001	0.05	32.6916	44.9491

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	3.4190	4.2694	35	0.80	0.4286	0.05	-5.2483	12.0864
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-1.3040	4.2694	35	-0.31	0.7619	0.05	-9.9713	7.3634
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	2.9939	4.2694	35	0.70	0.4878	0.05	-5.6734	11.6613
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-5.1331	4.2694	35	-1.20	0.2373	0.05	-13.8005	3.5342
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-9.1510	4.2694	35	-2.14	0.0391	0.05	-17.8183	-0.4836
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-7.5538	4.2694	35	-1.77	0.0856	0.05	-16.2212	1.1135
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-4.7230	4.2694	35	-1.11	0.2762	0.05	-13.3904	3.9443
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-0.4251	4.2694	35	-0.10	0.9213	0.05	-9.0925	8.2422
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	-8.5521	4.2694	35	-2.00	0.0530	0.05	-17.2195	0.1152
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-12.5700	4.2694	35	-2.94	0.0057	0.05	-21.2374	-3.9027
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	-10.9729	4.2694	35	-2.57	0.0146	0.05	-19.6402	-2.3055
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	4.2979	4.2694	35	1.01	0.3210	0.05	-4.3694	12.9653
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	-3.8291	4.2694	35	-0.90	0.3759	0.05	-12.4965	4.8382
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	-7.8470	4.2694	35	-1.84	0.0746	0.05	-16.5143	0.8204
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	-6.2498	4.2694	35	-1.46	0.1522	0.05	-14.9172	2.4175
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	-8.1270	4.2694	35	-1.90	0.0652	0.05	-16.7944	0.5403
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	-12.1449	4.2694	35	-2.84	0.0074	0.05	-20.8122	-3.4775
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	-10.5477	4.2694	35	-2.47	0.0185	0.05	-19.2151	-1.8804
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	-4.0179	4.2694	35	-0.94	0.3531	0.05	-12.6852	4.6495
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	-2.4207	4.2694	35	-0.57	0.5743	0.05	-11.0881	6.2466
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	1.5971	4.2694	35	0.37	0.7106	0.05	-7.0702	10.2645

7.7 Statistische Analyse nach 26 Wochen, Applikation: *slow release* und lokal

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	ID
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Aplication	2	control slow release
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	24
Columns in Z Per Subject	1
Subjects	42
Max Obs Per Subject	2

Number of Observations	
Number of Observations Read	84
Number of Observations Used	84
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates					
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Intercept	ID	4.6536	8.1452	0.57	0.2839
Residual		43.3091	10.3528	4.18	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	494.3
AIC (smaller is better)	498.3
AICC (smaller is better)	498.5
BIC (smaller is better)	501.8

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Application	1	35	0.30	0.5871
Med	6	35	5.76	0.0003
Application*Med	6	35	1.73	0.1429

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	24.8227	2.0940	35	11.85	<.0001	0.05	20.5717	29.0737
Med	BMP 48µg	33.6255	2.0940	35	16.06	<.0001	0.05	29.3746	37.8765
Med	BMP 96µg	40.2744	2.0940	35	19.23	<.0001	0.05	36.0234	44.5254
Med	Kom.1,5+24µg	38.6638	2.0940	35	18.46	<.0001	0.05	34.4128	42.9148
Med	Kom.1,5+48µg	33.5697	2.0940	35	16.03	<.0001	0.05	29.3187	37.8207
Med	Kom.6+24µg	33.1533	2.0940	35	15.83	<.0001	0.05	28.9023	37.4042
Med	Kom.6+48µg	31.5661	2.0940	35	15.07	<.0001	0.05	27.3151	35.8171

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	-8.8029	2.9613	35	-2.97	0.0053	0.05	-14.8147	-2.7911
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-15.4517	2.9613	35	-5.22	<.0001	0.05	-21.4635	-9.4399
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	-13.8411	2.9613	35	-4.67	<.0001	0.05	-19.8529	-7.8293
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-8.7470	2.9613	35	-2.95	0.0056	0.05	-14.7588	-2.7352
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-8.3306	2.9613	35	-2.81	0.0080	0.05	-14.3424	-2.3188
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-6.7434	2.9613	35	-2.28	0.0290	0.05	-12.7552	-0.7316
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-6.6488	2.9613	35	-2.25	0.0312	0.05	-12.6606	-0.6371
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-5.0383	2.9613	35	-1.70	0.0977	0.05	-11.0500	0.9735
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	0.05584	2.9613	35	0.02	0.9851	0.05	-5.9560	6.0676
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	0.4723	2.9613	35	0.16	0.8742	0.05	-5.5395	6.4841
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	2.0594	2.9613	35	0.70	0.4914	0.05	-3.9524	8.0712
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	1.6106	2.9613	35	0.54	0.5900	0.05	-4.4012	7.6224
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	6.7047	2.9613	35	2.26	0.0299	0.05	0.6929	12.7165
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	7.1211	2.9613	35	2.40	0.0216	0.05	1.1094	13.1329
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	8.7083	2.9613	35	2.94	0.0058	0.05	2.6965	14.7201
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	5.0941	2.9613	35	1.72	0.0942	0.05	-0.9177	11.1059
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	5.5106	2.9613	35	1.86	0.0712	0.05	-0.5012	11.5223
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	7.0977	2.9613	35	2.40	0.0220	0.05	1.0859	13.1095
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	0.4165	2.9613	35	0.14	0.8890	0.05	-5.5953	6.4282
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	2.0036	2.9613	35	0.68	0.5031	0.05	-4.0082	8.0154
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	1.5871	2.9613	35	0.54	0.5954	0.05	-4.4246	7.5989

7.8 Statistische Analyse alle Zeitpunkte gemittelt, Applikation: *slow release* und lokal

Model Information	
Data Set	WORK.NILS1
Dependent Variable	Area_proc
Covariance Structure	Variance Components
Subject Effect	ID
Estimation Method	MIVQUE0
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Containment

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Aplication	2	control slow release
Med	7	BMP 24µg BMP 48µg BMP 96µg Kom.1,5+24µg Kom.1,5+48µg Kom.6+24µg Kom.6+48µg
Zeit	3	12 weeks 26 weeks 4 weeks

Dimensions	
Covariance Parameters	2
Columns in X	96
Columns in Z Per Subject	1
Subjects	126
Max Obs Per Subject	2

Number of Observations	
Number of Observations Read	252
Number of Observations Used	252
Number of Observations Not Used	0

Covariance Parameter Estimates					
Cov Parm	Subject	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Intercept	ID	10.8871	5.9122	1.84	0.0328
Residual		48.7088	6.7225	7.25	<.0001

Fit Statistics	
-2 Res Log Likelihood	1526.0
AIC (smaller is better)	1530.0
AICC (smaller is better)	1530.1
BIC (smaller is better)	1535.7

Type 3 Tests of Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Application	1	105	4.87	0.0295
Med	6	105	4.91	0.0002
Application*Med	6	105	1.57	0.1644
Time	2	105	74.94	<.0001
Application*Time	2	105	1.14	0.3230
Med*Time	12	105	2.93	0.0015
Application*Med*Time	12	105	1.49	0.1407

Least Squares Means									
Effect	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	24.4592	1.3992	105	17.48	<.0001	0.05	21.6848	27.2336
Med	BMP 48µg	26.0708	1.3992	105	18.63	<.0001	0.05	23.2964	28.8453
Med	BMP 96µg	32.1873	1.3992	105	23.00	<.0001	0.05	29.4129	34.9618
Med	Kom.1,5+24µg	27.2777	1.3992	105	19.49	<.0001	0.05	24.5032	30.0521
Med	Kom.1,5+48µg	31.3329	1.3992	105	22.39	<.0001	0.05	28.5585	34.1073
Med	Kom.6+24µg	31.7766	1.3992	105	22.71	<.0001	0.05	29.0022	34.5510
Med	Kom.6+48µg	30.4836	1.3992	105	21.79	<.0001	0.05	27.7091	33.2580

Differences of Least Squares Means										
Effect	Med	Med	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Alpha	Lower	Upper
Med	BMP 24µg	BMP 48µg	-1.6116	1.9788	105	-0.81	0.4172	0.05	-5.5353	2.3120
Med	BMP 24µg	BMP 96µg	-7.7281	1.9788	105	-3.91	0.0002	0.05	-11.6518	-3.8045
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+24µg	-2.8185	1.9788	105	-1.42	0.1573	0.05	-6.7421	1.1052
Med	BMP 24µg	Kom.1,5+48µg	-6.8737	1.9788	105	-3.47	0.0007	0.05	-10.7973	-2.9501
Med	BMP 24µg	Kom.6+24µg	-7.3174	1.9788	105	-3.70	0.0003	0.05	-11.2410	-3.3937
Med	BMP 24µg	Kom.6+48µg	-6.0244	1.9788	105	-3.04	0.0029	0.05	-9.9480	-2.1007
Med	BMP 48µg	BMP 96µg	-6.1165	1.9788	105	-3.09	0.0026	0.05	-10.0401	-2.1929
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+24µg	-1.2068	1.9788	105	-0.61	0.5433	0.05	-5.1305	2.7168
Med	BMP 48µg	Kom.1,5+48µg	-5.2621	1.9788	105	-2.66	0.0091	0.05	-9.1857	-1.3384
Med	BMP 48µg	Kom.6+24µg	-5.7057	1.9788	105	-2.88	0.0048	0.05	-9.6294	-1.7821
Med	BMP 48µg	Kom.6+48µg	-4.4127	1.9788	105	-2.23	0.0279	0.05	-8.3364	-0.4891
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+24µg	4.9097	1.9788	105	2.48	0.0147	0.05	0.9860	8.8333
Med	BMP 96µg	Kom.1,5+48µg	0.8544	1.9788	105	0.43	0.6668	0.05	-3.0692	4.7781
Med	BMP 96µg	Kom.6+24µg	0.4108	1.9788	105	0.21	0.8360	0.05	-3.5129	4.3344
Med	BMP 96µg	Kom.6+48µg	1.7038	1.9788	105	0.86	0.3912	0.05	-2.2199	5.6274
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.1,5+48µg	-4.0552	1.9788	105	-2.05	0.0429	0.05	-7.9789	-0.1316
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+24µg	-4.4989	1.9788	105	-2.27	0.0250	0.05	-8.4225	-0.5753
Med	Kom.1,5+24µg	Kom.6+48µg	-3.2059	1.9788	105	-1.62	0.1082	0.05	-7.1295	0.7177
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+24µg	-0.4437	1.9788	105	-0.22	0.8230	0.05	-4.3673	3.4800
Med	Kom.1,5+48µg	Kom.6+48µg	0.8493	1.9788	105	0.43	0.6686	0.05	-3.0743	4.7730
Med	Kom.6+24µg	Kom.6+48µg	1.2930	1.9788	105	0.65	0.5149	0.05	-2.6306	5.2166

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.- J. Kramer und Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Förderung meiner klinischen Ausbildung.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen, vor allem bei Frau Antje Ahrbecker für die allzeitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. N. Moser für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche sowie für die unermüdliche Bereitschaft, mir wissenschaftlich und technisch mit Rat und Tat jederzeit zur Seite zu stehen.