

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

**Induktion der Knochenneubildung
durch Implantation von mit rhBMP-2 und VEGF beladenen Polylaktidträgern
im ektopen Tiermodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jan Goldstein
aus
Soest

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 24.01.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochengewebe	1
1.1.1	Knochenstruktur	1
1.1.2	Knochenphysiologie	3
1.2	Knochenersatz	5
1.2.1	Knochenersatzmaterialien	6
1.2.2	Problematik und Nachteile des Knochenersatzes	8
1.3	Tissue Engineering	10
1.3.1	Übersicht	10
1.3.2	Wachstumsfaktoren	11
1.3.3	Trägermaterialien	13
1.4	Das ektope Tiermodell	16
1.5	Zusammenfassung und Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.2	Chemikalien und Reagenzien	19
2.3	Software	19
2.4	Polylaktidträger	20
2.4.1	Materialzusammensetzung u. -herstellung	20
2.4.2	Beladung mit Wachstumsfaktoren	20
2.5	Versuchstiere	22
2.5.1	Tierversuchsgenehmigung	22
2.5.2	Herkunft und Haltung	22
2.5.3	Versuchsplanung	22
2.6	Operatives Vorgehen	24
2.6.1	Narkoseverfahren	24
2.6.2	Operation der Tiere	24
2.6.3	Prä- und postoperative Analgesie	25
2.6.4	Entnahme der Präparate	25
2.7	Einbetten und Anfertigung der Schliffpräparate	26
2.7.1	Vorbehandlung des Gewebes	26
2.7.2	Polymerisation	27
2.7.3	Anfertigung der Trenn-Dünnschliff-Präparate	27
2.8	Färbung	28

Inhaltsverzeichnis

2.9	Mikroskopische Untersuchung	29
2.9.1	Bildgebung	29
2.9.2	Bildbearbeitung und -auswertung	30
2.10	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	rhBMP-2	31
3.1.1	rhBMP-2 inkorporiert	31
3.1.2	rhBMP-2 aufgetropft	34
3.2	VEGF	37
3.2.1	VEGF inkorporiert	37
3.2.2	VEGF aufgetropft	39
3.3	Kombinationspräparate (VEGF + rhBMP-2)	41
3.3.1	VEGF und rhBMP-2 inkorporiert	41
3.3.2	VEGF und rhBMP-2 aufgetropft	45
3.4	Kontrollgruppen	49
3.5	Vergleich der Applikationsarten	50
3.5.1	rhBMP-2	50
3.5.2	Kombinationspräparat	51
3.6	Vergleich von rhBMP-2 mit Kombinationspräparaten	52
3.6.1	96 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)	52
3.6.2	48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)	53
3.6.3	48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)	54
3.6.4	24 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)	55
4	Diskussion	57
4.1	Applikation von Wachstumsfaktoren zur Knochenneubildung	57
4.2	Polylaktid als Trägermaterial	59
4.2.1	Kontrollierte Freisetzung und Knochenneubildung	59
4.2.2	Modifikation der Polylaktidimplantate mit Kalziumkarbonat und Knochen- neubildung	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
7	Anhang	77
7.1	Statistische Auswertung	77
7.1.1	Globaler Test	77

Inhaltsverzeichnis

7.1.2	Paarvergleiche der Konzentrationen	77
7.1.3	Vergleich der beiden Applikationsarten	79
7.2	Abbildungsverzeichnis	80
7.3	Tabellenverzeichnis	82
7.4	Abdruckgenehmigung	83

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AP	alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
IGF	insulin-like growth factor
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
l	Liter
m	Milli
mind.	mindestens
PDGF	platelet-derived growth factor
PDLLA	Poly-DL-laktid (engl. poly-DL-lactic acid)
PGA	Polyglycolsäure (engl. polyglycolic acid)
PLA	Polylaktid (engl. polylactic acid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
RFID	radio-frequency identification
rhBMP-2	recombinant human bone morphogenetic protein 2
stab.	stabilisiert
TGF- β	transforming growth factor β
VEGF	vascular endothelial growth factor
%	Prozent
μ	Mikro

1 Einleitung

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie kommt der Behandlung von Kieferknochendefekten, die durch Tumoren, Traumata oder auch angeborene Fehlbildungen hervorgerufen werden, eine zentrale Bedeutung zu. Gegenstand vieler aktueller Forschungsprojekte ist die Suche nach Methoden zur Verbesserung der Knochenregeneration bzw. -heilung. Dabei ist es essentiell, Knochengewebe in seiner Struktur und Physiologie zu verstehen, um so in Heilungs- und Regenerationsprozesse eingreifen zu können.

1.1 Knochengewebe

Knochengewebe stellt eine spezielle Form des Bindegewebes dar, die sowohl fest und hart als auch druck- und zugfest ist. Aufgrund dieser Eigenschaften hat Knochengewebe eine große Bedeutung für den Bewegungsapparat. Es stützt den Körper und bietet zahlreiche Ansatzstellen für Sehnen und Muskeln, die so im Zusammenspiel den Bewegungsapparat ausmachen. Des Weiteren umhüllt und schützt das Knochengewebe das zentrale Nervensystem und innere Organe und ist in der Lage, metabolische Aufgaben zu übernehmen, indem es u. a. über die Nahrung aufgenommenes Kalzium im Skelett speichert. Hormonell reguliert, kann es Kalzium wieder ans Blut abgeben und so die Homöostase aufrechterhalten (Junqueira und Carneiro 2004, Welsch 2010).

Makroskopisch unterscheidet man kompakten Knochen (Substantia compacta), der am Rand von Knochen, v.a. Röhren- oder Langknochen, als verdichtetes Gewebe lokalisiert ist, von spongiösem Knochen (Substantia spongiosa), der das Innere des Knochens bildet. Spongiöser Knochen ist durch feine, schwammartig verzweigte Knochen trabekel gekennzeichnet, zwischen denen Blutgefäße verlaufen und Knochenmark und Fettgewebe zu finden sind. Die Anordnung der Trabekel richtet sich nach der jeweiligen Belastung und ist so entscheidend für Widerstandsfähigkeit und Stärke des betroffenen Skelettelements. Außer an den Ansatzstellen der Sehnen und an den Gelenkflächen sind alle Knochenoberflächen mit Periost bedeckt, welches zahlreiche Nervenfasern und Blut- und Lymphgefäße enthält (Datta et al. 2008, Soldner und Herr 2001).

1.1.1 Knochenstruktur

Knochen setzt sich zusammen aus der extrazellulären, kalziumreichen Knochenmatrix und den Knochenzellen.

Knochenmatrix Die Knochenmatrix besteht zum größten Teil (ca. 65%) aus anorganischem Material, dem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). Dabei handelt es sich um kristallisiertes Kalziumphosphat, was dem Knochen hohe Festigkeit verleiht. Der restliche Teil (ca. 35%) wird durch

1 Einleitung

organische Bestandteile, v.a. Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine, gebildet (Welsch 2010). Diese unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix sind entscheidend für die besonderen und vielfältigen Eigenschaften des Knochengewebes.

Knochenzellen Zytologisch lassen sich verschiedene Knochenzellen voneinander unterscheiden. So finden sich zum einen Osteoblasten, die sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen entwickeln und verantwortlich sind für die Bildung der organischen Knochenmatrix. Sie scheiden zunächst organisches Knochenmaterial, das sogenannte Osteoid, ab, bei dem es sich um nicht verkalkte Matrix handelt. Es setzt sich zusammen aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Kollagen Typ I. In einem zweiten Schritt erfolgt die Mineralisierung des Osteoids durch Ablagerung von Kalziumphosphat. Osteoblasten befinden sich v.a. bei aktivem Knochenwachstum auf der Matrixoberfläche (Ducy et al. 2000, Harada und Rodan 2003, Rochefort et al. 2010, Welsch 2010).

Zum anderen finden sich Osteozyten, welche aus den Osteoblasten hervorgehen und in Lakunen in der im Zuge der Ossifikation verkalkten Knochenmatrix eingelagert sind. Sie machen die Hauptzellart des Knochengewebes aus und stehen mit benachbarten Osteozyten über ihre in Canaliculi gestreckten Fortsätze (Dendriten) in Verbindung (Rochefort et al. 2010). Über *gap junctions* können sie sowohl miteinander als auch mit Zellen auf der Oberfläche des Knochengewebes kommunizieren. Sie scheinen eine zentrale Rolle bei der Erfassung von mechanischen Stimuli und der Einleitung von Umbauprozessen zu spielen (Bonewald und Johnson 2008, Civitelli 2009, Jakob et al. 2008, Papachroni et al. 2009, Rochefort et al. 2010).

Zudem lassen sich zytologisch Osteoklasten abgrenzen. Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die aus Monozyten hervorgehen und zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) gehören. Ihre Funktion ist die Resorption von verkalkter Knochenmatrix, durch die sie im Zusammenspiel mit Osteoblasten Knochen um- und neu bauen können. Dies geschieht durch zunächst Anheftung an das Knochengewebe und Schaffung eines sauren Milieus mithilfe von H^+ -ATPasen, was zu einer Auflösung der Apatitkristalle (Demineralisierung) führt (Bar-Shavit 2007, Teitelbaum 2000). Es schließt sich die Sekretion von Enzymen wie Kollagenasen und Kathepsinen an, die dann das im Verlauf der Demineralisierung freigelegte Kollagen abbauen. Diese Um- und Abbauprozesse, die ein Leben lang stattfinden und an denen Osteoblasten, Osteoklasten und auch Osteozyten beteiligt sind, bezeichnet man als *bone remodeling* (Bar-Shavit 2007, Papachroni et al. 2009, Silver et al. 1988, Teitelbaum 2000, Teitelbaum und Ross 2003).

Histologisch lässt sich Knochengewebe in Geflecht- und Lamellenknochen unterteilen. Geflechtknochen kommt nur bei der Knochenentwicklung und bei Reparaturprozessen vor und ist im Gegensatz zum Lamellenknochen durch ungeordnete Kollagenfibrillen gekennzeichnet.

Lamellenknochen entwickelt sich aus Geflechtknochen und ist, wie sein Name vermuten lässt, charakterisiert durch eine komplexe Organisation aus Knochenlamellen und -kanälen, bei der sich besonders in der Kompakta Knochenlamellen konzentrisch um einen längsverlaufenden, gefäßführenden Havers-Kanal anordnen (Havers-System) (Welsch 2010). Zwischen diesen Lamellen findet man Osteozyten. Die Querverbindung verschiedener Havers-Kanäle und die Verbindung mit der Knochenmarkshöhle erfolgt über sog. Volkmann-Kanäle (Datta et al. 2008, Junqueira und Carneiro 2004).

1.1.2 Knochenphysiologie

Ossifikation Knochen kann entweder durch desmale oder chondrale Ossifikation entstehen. Bei beiden Arten der Knochenbildung entsteht zunächst Geflechtknochen, der im weiteren Verlauf in Lamellenknochen umgewandelt wird (Junqueira und Carneiro 2004).

Die desmale oder auch direkte Knochenbildung betrifft Maxilla und Mandibula sowie die flachen Schädelknochen. Man versteht darunter die direkte Knochenentstehung aus einer Verdichtung von Mesenchymzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren, die wiederum Osteoid abscheiden, welches anschließend verkalkt (Kapitel 1.1.1). Diese Verdichtung von Mesenchymzellen nennt man Ossifikationszentrum. Die direkte Knochenbildung geht zeitgleich von mehreren dieser Zentren aus, die im weiteren Verlauf miteinander verschmelzen.

Bei der chondralen Ossifikation hingegen ist es so, dass das sich bildende Knochelement zunächst knorpelig angelegt und abgebaut und erst in einem weiteren Schritt durch Knochengewebe ersetzt wird. Hierbei dringen nach der Hypertrophie der Chondrozyten des Ersatzknochelements mesenchymale Stammzellen über einsprossende Blutgefäße in die hinterlassenen Hohlräume ein, die sich dann zu Osteoblasten differenzieren und Knochenmatrix bilden. Vor allem Röhrenknochen entstehen auf diese Weise (Junqueira und Carneiro 2004).

Regulation Knochengewebe ist ein aktives Gewebe, dessen Erhalt und Umbauvorgänge entscheidend von der mechanischen Belastung abhängen. Die Osteozyten scheinen hier maßgeblich an der Mechanotransduktion, also der Umwandlung biophysikalischer Kräfte in biochemische Signale, beteiligt zu sein. Selbst der programmierte Zelltod (Apoptose) von Osteozyten, der z.B. bei sehr hoher Beanspruchung des Gewebes auftreten kann, stellt ein Signal zur Einleitung von Remodeling-Prozessen dar. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt (Noble und Reeve 2000, Rochefort et al. 2010).

Neben der Anpassung an mechanische Veränderungen unterliegt Knochengewebe zudem einer hormonellen Regulation, bei der der Kalzium- bzw. Phosphathaushalt im Mittelpunkt steht. So bewirkt Parathormon aus den Nebenschilddrüsen am Knochen eine erhöhte Aktivität von Osteoklasten. In der Niere steigert es die Resorption und im Darm indirekt die Absorption von Kalzium. Stimuliert wird die Freisetzung des Hormons durch eine Hypokalziämie. Die Folge ist eine Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen und eine Erhöhung der Plasmakalziumkonzentration (Junqueira und Carneiro 2004). Gegenteilig wirkt das Hormon Kalzitinin der C-Zellen der Schilddrüse, das die Osteoklasten und somit die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen hemmt. Auch Östrogene besitzen einen kalziumsenkenden Effekt, wobei hier die Wirkung über eine Verminderung der Zahl der Osteoklasten erzielt wird (Harada und Rodan 2003, Junqueira und Carneiro 2004).

Vitamin D wirkt indirekt positiv auf die Knochenmineralisation, indem es die Absorption von Kalzium und Phosphat in der Niere und die Resorption im Darm fördert. Zudem hat es auch eine direkte aktivierende Wirkung auf Osteoblasten und -klasten. Beide Effekte zusammen fördern Knochenaufbau bzw. -umbau (Rassow et al. 2008).

1 Einleitung

Frakturheilung Weil es sich bei Knochen um ein dynamisches und sehr gut durchblutetes Gewebe handelt, besitzt Knochengewebe ein starkes regeneratives Potential. Knochenfrakturen heilen innerhalb bestimmter Grenzen selbstständig aus. Man unterscheidet die primäre von der sekundären Frakturheilung. Welche Art der Frakturheilung stattfindet, ist abhängig vom Ausmaß der Stabilisierung bzw. Immobilisation der Frakturrenden, von der Vaskularisierung der Fraktur und von der Breite des Frakturspaltes.

Unter der primären Frakturheilung oder auch Kontaktheilung versteht man die Ausheilung mit unmittelbarer Überbrückung des engen Frakturspaltes durch aussprossende Kapillaren und Osteone. Bei einem größerem Frakturspalt wird dieser zunächst durch Granulationsgewebe und später durch Bindegewebe ausgefüllt (Kallusbildung). Dieser Kallus wird unter stabilen Verhältnissen dann in Knochengewebe umgewandelt. Man bezeichnet diesen Vorgang als sekundäre Frakturheilung (Schenk und Willenegger 1963, 1964, Schwenzer und Ehrenfeld 2010, Welsch 2010).

1.2 Knochenersatz

Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien spielen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eine bedeutende Rolle. Traumata, Krankheiten, Fehlbildungen und Tumorsektionen haben oftmals große Knochendefekte zur Folge und stellen nach wie vor häufig eine kurative Herausforderung dar (Kübler 1997).

Wirft man einen Blick in die Geschichte der Medizin bzw. der Chirurgie, ist festzustellen, dass man bereits im 17. Jahrhundert die Idee hatte, Knochendefekte mit Transplantaten aufzufüllen. 1668 deckte der holländische Arzt Job van Meekeren einen traumabedingten Defekt im Schädelknochen eines Soldaten mit einem Stück Kalottenknochen eines Hundes (Van Meekeren 1668). Etwa 200 Jahre später beschrieb der französische Chirurg Louis Ollier im Tierexperiment die Grundprinzipien der Transplantation von *autogenem*, *allogenen* und *xenogenem* Knochengewebe (Ollier 1867). Ende des 19. Jahrhunderts prägte Arthur Barth den Begriff des „schleichenden Ersatzes“ bzw. die Leitschientheorie, welche besagt, dass das Transplantat vom Transplantatlager aus allmählich durch vitalen Knochen ersetzt wird (Barth 1893). Anfang des letzten Jahrhunderts setzte sich u.a. Lexer dann mit der Qualität des Transplantatlagers auseinander, welches entscheidend ist für die erfolgreiche Einheilung eines Knochenersatzmaterials. Dabei unterscheidet man das *ersatzstarke*, *ersatzschwache* und *ersatzunfähige* Lager (Lexer 1911). Zu dieser Zeit begann auch die wissenschaftliche Untersuchung der Einheilungsvorgänge per se. Axhausen und Lexer sahen dabei die mit dem Gewebe transplantierten Zellen des Peri- und Endosts als essentiell für den Einheilungsvorgang an und prägten so den Begriff der „Osteoblastentheorie“ (Axhausen 1907, Lexer 1929). Demgegenüber stand die „Bindegewebslehre“ von Leriche und Policard. Sie waren davon überzeugt, dass sich im Zuge der Knochenregeneration benachbartes Bindegewebe in Knochengewebe umwandelt (Leriche und Policard 1926). Der schwedische Chirurg Levander sah dagegen ähnlich wie Barth das Transplantatlager als Ursprung der Knochenregeneration an und vertrat mit der „Induktionstheorie“ die Meinung, dass das mesenchymale Gewebe des Lagers durch den transplantierten Knochen zur Knochenneubildung angeregt wird (Levander 1938). Ein tieferes Verständnis der Knochenregeneration erlangte man schließlich durch die Untersuchungen Axhausens, der die „Osteoblastentheorie“ und „Induktionstheorie“ vereinte und so die Grundlage für das heutige Verständnis über die Einheilungsvorgänge eines Transplantates legte. Er kam zu dem Ergebnis, dass es sich bei der Knochenregeneration um ein „zweiphasiges Geschehen“ handelt. Dabei werde die Knochenregeneration in einer ersten kurzen Phase durch spezifische, osteogene Zellen und in einer zweiten, über Wochen anhaltenden Phase durch Bindegewebszellen angeregt (Axhausen 1952).

Mittlerweile ist bekannt, dass der Einheilungsprozess einen noch komplexeren Vorgang darstellt und in mehreren Phasen verläuft (Bauer und Muschler 2000).

1.2.1 Knochenersatzmaterialien

Bei der Behandlung von Knochendefekten mit Knochenersatzmaterialien bzw. Knochentransplantaten gilt als oberstes Ziel die *restitutio ad integrum*, d.h. eine vollständige Wiederherstellung des Ausgangszustandes zu erreichen (Horch und Pautke 2006).

Es stehen grundsätzlich drei Wirkprinzipien zur Erreichung der Osteoneogenese im Mittelpunkt, die je nach Material in unterschiedlichem Ausmaß zum Tragen kommen. Von *osteogener* Wirkung spricht man, wenn ein Material Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen enthält, die dann im Zielgebiet Knochensubstanz produzieren (Finkemeier 2002, Kübler et al. 1999). Bei der *Osteoinduktion* kommt es zu einer Stimulation der lokalen Zellen, meist undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen, die sich dann zu Osteoblasten differenzieren. Besitzt ein Material *osteokonduktive* Wirkung, so dient es als geeignete Leitstruktur zum Einwachsen von neu gebildetem Knochen (Burchardt 1983, DeLong et al. 2007, Kübler 1997, Urist 1965).

Neben diesen Eigenschaften ergeben sich weitere Anforderungen an ein optimales Knochenersatzmaterial. So darf es kein Infektionsrisiko darstellen, d.h. eine Übertragung von pathogenen Erregern über das Knochenersatzmaterial muss ausgeschlossen sein (Horch und Pautke 2006). Weiter sollte es zu keiner Abstoßung des Materials oder zu einer Allergisierung kommen (Friedlaender 1983). Nicht minder wichtig ist eine geringe Entnahmemorbidität (Horch und Pautke 2006). Zudem sollte es ausreichend stabil und resorbierbar sein. Bei fehlender oder nur geringer Resorbierbarkeit wird der Knochendefekt zwar ausgefüllt, doch resultiert an dieser Stelle eine Schwächezone, die meist nicht wie physiologischer Knochen belastet werden kann. Im schlimmsten Fall kommt es bei entsprechender Krafteinwirkung zur Fraktur (Horch und Pautke 2006).

Dieses breite Spektrum von Eigenschaften wird aktuell durch keines der verfügbaren Knochenersatzmaterialien vollständig abgedeckt. Jedoch ist man sich einig, dass dem autologen Knochentransplantat aufgrund seiner Eigenschaften und weil es in hohem Maß die oben aufgeführten Kriterien erfüllt, die höchste therapeutische Bedeutung zukommt. Es wird daher aktuell als sog. „Goldstandard“ angesehen (Gazdag et al. 1995, Moore et al. 2001, Rentsch et al. 2012, St John et al. 2003). Neben autologem Knochen unterscheidet man noch das allogene und xenogene Transplantat und alloplastisches Knochenersatzmaterial (Bauer und Muschler 2000).

Autologer/autogener Knochenersatz Unter einem autologen Knochentransplantat versteht man Knochen, der an einer bestimmten Stelle des Körpers eines Individuums entnommen und an eine anderen Stelle desselbigen transplantiert wird (Rentsch et al. 2012). Das autologe Knochentransplantat hat grundsätzlich sowohl osteogene Potenz als auch osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften (Moore et al. 2001). Diese Tatsache macht den autologen Knochenersatz zum „Goldstandard“ in der Therapie von Knochendefekten. Ein großer Vorteil ist, dass bei ordnungsgemäßer Entnahme und Transplantation kein Risiko einer Übertragung von pathogenen Erregern und einer immunologischen Abstoßungsreaktion besteht, was das autologe Transplantat aktuell zur sichersten Transplantatform macht (Horch und Pautke 2006, Schwenzer und Ehrenfeld 2010). Beim autologen Knochenersatz unterscheidet man spongiöse, kortikale, kortiko-spongiöse und vaskularisierte Transplantate (Rentsch et al. 2012). Der Knochen kann je nach benötigter Menge

1 Einleitung

von verschiedenen Stellen des Körpers entnommen werden. Dabei stellt die Beckenkammregion aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit und Größe ein sehr ergiebiges Knochenresevoir sowohl für spongiösen als auch für kortikalen Knochen dar. Weitere Möglichkeiten der Knochengewinnung bestehen an Tibia, Radius oder an den Rippen (Finkemeier 2002, Lindner und Henry 1992). Als intraorale Entnahmestelle wird z.B. im Unterkiefer häufig die Retromolarregion herangezogen (Nkenke et al. 2002).

Spongiöse und kortikale autologe Knochentransplantate weisen hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens Unterschiede auf. So zeichnet sich das spongiöse Transplantat durch eine rasche Revascularisierung und Inkorporation in das Transplantatbett bei anfangs geringerer mechanischer Stabilität aus (Finkemeier 2002). Kortikale Transplantate dagegen sind in erster Linie durch ihre biomechanischen Eigenschaften charakterisiert und bieten strukturelle Stabilität an der Transplantationsstelle, wobei diese im Laufe der Resorptionsvorgänge verloren geht (Burchardt 1983). Die osteogene Wirkung steht hier im Hintergrund, da kortikale Transplantate weniger osteogene Zellen wie Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen im Vergleich zu reiner Spongiosa enthalten. Meist finden kortiko-spongiöse Transplantate ihre Anwendung, da sie Eigenschaften beider Formen vereinen (Horch und Pautke 2006, Rentsch et al. 2012). Bei den vaskularisierten Transplantaten erfolgt eine Unterteilung in haut-, muskel- und gefäßgestielt. Diese Art der Knochentransplantate ist angezeigt bei sehr großen Defekten, z.B. nach Tumorsektion, da sie durch ihre eigene permanente Vaskularisation auch bei ersatzschwachem Transplantatlager gut einheilen und hohe Überlebensraten aufweisen (Hierner et al. 2009).

Allogener Knochenersatz Allogenes Knochengewebe entstammt einem anderen Individuum derselben Spezies. Beim Menschen handelt es sich dabei also um humanen Spenderknochen (Schwenzer und Ehrenfeld 2010). Aufgrund des Risikos einer Übertragung von Krankheitserregern und Infektionen und aus Gründen der Konservierung muss allogener Knochen vorbehandelt werden. Maßnahmen wie z.B. Autoklavierungs- und Thermodesinfektionsverfahren sollen das Risiko senken, jedoch möglichst nicht die biologisch wirksamen Faktoren denaturieren, die essentiell für eine Knochenstimulation sind (Herr und Schmid 2001). Weitere Verfahren zur Sterilisation sind die Bestrahlung des allogenen Knochens mit Gammastrahlen, die Alkoholesinfektion und die Gassterilisation. Je nach Verfahren kommt es dennoch zu einer mehr oder minder großen Reduktion der biologischen Wertigkeit, sodass allogene Knochentransplantate in erster Linie osteokonduktive neben einer geringeren, durch *bone morphogenetic protein* (BMP) (Kapitel 1.3.2) vermittelten osteoinduktiven Wirkung besitzen. Es besteht außerdem das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion durch den Empfänger (Garrel und Gotzen 1998, Rentsch et al. 2012, Schwenzer und Ehrenfeld 2010, Soldner und Herr 2001).

Zur Gruppe des allogenen Knochenersatzes gehört auch die demineralisierte Knochenmatrix, die durch Zerkleinerung und Demineralisierung allogenen Knochens gewonnen wird. Sie bietet einwachsendem Knochen eine Leitstruktur und ist auch osteoinduktiv wirksam. Da demineralisierte Knochenmatrix jedoch kaum mechanische Stabilität besitzt, ist sie eher als Füllmaterial für Knochendefekte geeignet (DeLong et al. 2007, Finkemeier 2002, Giannoudis et al. 2005, Kübler 1997, Soldner und Herr 2001, Urist 1965).

Xenogener Knochenersatz Xenogenes Knochenersatzmaterial stammt von einer anderen Spezies und hat osteokonduktive Eigenschaften. Bevor es klinisch zum Einsatz kommt, wird das Knochengewebe vorbehandelt, sodass die organischen Komponenten entfernt werden und damit Infektions- und Allergisierungsrisiko gesenkt werden. Wie beim allogenen Transplantat besteht die Gefahr einer Abstoßungsreaktion (Kaveh et al. 2010, Schwenzer und Ehrenfeld 2010).

Alloplastischer Knochenersatz Die heterogene und große Gruppe der alloplastischen Knochenersatzmaterialien umfasst zahlreiche meist synthetisch hergestellte Materialien, die je nach chemischen und biologischen Eigenschaften osteokonduktiv wirken und zum Teil parallel zur Knochenregeneration vom Körper resorbiert werden (Kübler 1997).

Am häufigsten verwendet werden Kalziumphosphatverbindungen in Form von Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphat in Keramiken, die eine sehr gute Biokompatibilität besitzen. Eine weitere Gruppe bilden die bioaktiven Gläser, die aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit einen guten Verbund mit dem anwachsenden Knochengewebe aufweisen (Moore et al. 2001, Rentsch et al. 2012). Synthetische Materialien können zudem mit osteoinduktiven Substanzen wie BMP versehen werden (DeLong et al. 2007).

1.2.2 Problematik und Nachteile des Knochenersatzes

Der autologe Knochenersatz stellt eine therapeutische Option von enormem Wert mit unbestrittenen Vorteilen dar (Kapitel 1.2.1). Dennoch bringt er auch einige Nachteile und mögliche Probleme mit sich, die einer kritischen Betrachtung bedürfen.

Die Gewinnung autologen Knochens macht eine Entnahmeoperation notwendig, die eine Zusatzbelastung und ein weiteres Risiko für den Patienten darstellt. Je nach Entnahmestelle werden verschiedene Komplikationen in der Literatur beschrieben. So kann die Entnahme autologen Knochens aus der Retromolarregion im Unterkiefer zur Augmentation vertikaler und horizontaler Alveolarfortsatzdefekte z.B. zu einer akzidentiellen Freilegung des N. alveolaris inferior und zu vorübergehender Sensibilitätsstörung der Wange und bukkalen Mukosa führen. Auch heftige Blutungen aus der A. buccalis scheinen gelegentlich aufzutreten (Nkenke et al. 2002). Ein weiterer Nachteil der intraoralen Spendeareale ist die begrenzte Menge an Knochen, die gewonnen wird und die lediglich für die Augmentation kleinerer Kieferbereiche verwendet werden kann (Horch und Pautke 2006, Nkenke et al. 2002). Müssen größere Knochendefekte versorgt werden, greift man in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie häufig auf autologen Knochen aus der Beckenkammregion zurück (Finkemeier 2002). Zwar zeichnet sich der entnommene Knochen durch eine hohe biologische Wertigkeit und ausreichende Menge aus, doch stehen diesen positiven Aspekten einer großen Bandbreite an Komplikationen gegenüber. Diese reichen von unästhetischer Narbenbildung und Blutungen über anhaltende Sensibilitäts- und Gangstörungen bis hin zur Herniation abdominaler Organe und Frakturen des Beckens. Auch postoperative Schmerzen werden beschrieben, die in manchen Fällen über mehrere Monate anhalten (Goulet et al. 1997, Joshi und Kostakis 2004, Kessler et al. 2005).

Allogener Knochenersatz zeichnet sich besonders durch seine einfache Verfügbarkeit aus, die durch Knochenbanken gewährleistet wird. Jedoch ergibt sich hier ein Spannungsfeld zwischen

1 Einleitung

der Sterilisation und Desinfektion des Transplantates einerseits und dem Erhalt osteoinduktiver Strukturen andererseits. Möchte man eine nahezu vollständige Sterilisation des Knochens und eine höchstmögliche Reduktion des Übertragungsrisikos pathogener Erreger wie beim Vorgang der Autoklavierung erreichen, führt dies zu einer Denaturierung des endogenen BMPs. Das Transplantat verliert damit seine osteoinduktive Wirkung und auch die mechanischen Eigenschaften werden negativ beeinflusst, sodass es häufig keine ausreichende Stabilität mehr aufweist (Garrel und Gotzen 1998, Herr und Schmid 2001, Kübler 1997, Rentsch et al. 2012). Weitere Nachteile des allogenen Knochentransplantates sind außerdem die Gefahr einer Übertragung von Krankheitserregern (Garrel und Gotzen 1998) und die Gefahr einer immunologischen Abstoßungsreaktion (Schwenzer und Ehrenfeld 2010).

Bei den alloplastischen Knochenersatzmaterialien treten je nach Material unterschiedliche Probleme und Nachteile auf. Keramiken auf Basis von Kalziumphosphat werden durch osteokonduktive Prozesse integriert, zeigen jedoch eine schlechte strukturelle Stabilität und geringe mechanische Belastbarkeit. Desweiteren ist ihr Resorptionsverhalten schwer einzuschätzen. Dies gilt auch für die Hydroxylapatitkeramiken, die eine hohe Brüchigkeit aufweisen und nur sehr langsam abgebaut werden. Deswegen sind diese Materialien bei großen Knochendefekten und in Bereichen mechanischer Beanspruchung schlecht einsetzbar, was ihren Einsatz auf kleinere Defekte beschränkt (DeLong et al. 2007, Hollinger und Battistone 1986, Rentsch et al. 2012, Sachlos und Czernuszka 2003, Salgado et al. 2004).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass keine der bisher entwickelten Methoden des Knochenersatzes vollständig die Anforderungen an ein optimales Knochenersatzmaterial erfüllt und dass jede Methode Einschränkungen und Nachteile aufweist. In diesem Zusammenhang bietet das Tissue Engineering neue Perspektiven in der regenerativen Therapie von Knochendefekten.

1.3 Tissue Engineering

1.3.1 Übersicht

Die Grundidee des Tissue Engineering ist die Rekonstruktion und Regeneration von Gewebe ohne dabei auf autologen Gewebeersatz mit seinen genannten Nachteilen und Einschränkungen zurückgreifen zu müssen. Es handelt sich dabei um ein interdisziplinäres Feld, welches sowohl die Prinzipien und Methoden der Ingenieurwissenschaften als auch das Wissen aus Medizin und Biologie über biologische Vorgänge im Körper, wie z.B. die Gewebeheilung, miteinander verbindet (Nerem und Sambanis 1995, Vacanti und Langer 1999).

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie beschäftigt sich das Tissue Engineering vor allem mit der Regeneration von Knochengewebe. Zudem wird auch an der Rekonstruktion von Knorpelgewebe, Schleimhaut und Speicheldrüsen geforscht. Grundlage aller Forschungsansätze und -ideen ist ein möglichst umfassendes Verständnis der biologischen Zusammenhänge des jeweiligen Gewebes, um so in die Regeneration eingreifen, sie verbessern und unterstützen zu können.

Die Regeneration von Knochengewebe ist ein komplizierter und komplex-regulierter Vorgang, der sich in der immer gleichen Abfolge von Entzündung, Proliferation und Remodeling abspielt (Schliephake 2010 a). Hierbei sind verschiedene Faktoren wie Zellen, extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren und Blutgefäße beteiligt, die auf unterschiedliche Weise räumlich und zeitlich koordiniert für das Tissue Engineering von zentraler Bedeutung sind (Gittens und Uludag 2001, Kneser et al. 2006, Salgado et al. 2004, Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

Man kann nun an verschiedenen Stellen bzw. an den jeweiligen beteiligten Faktoren des Regenerationsprozesses des Gewebes ansetzen.

Eine Möglichkeit ist, direkt osteogene Zellen mittels eines geeigneten Trägers in den Knochendefekt zu implantieren. Dort sollen diese sich dann weiter differenzieren und proliferieren und Knochengewebe bilden. Die verwendeten Zellen sollten dazu aus dem Organismus leicht isoliert und *in vitro* vermehrt werden können (Salgado et al. 2004). In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene Zellarten untersucht wie z.B. mesenchymale Stammzellen oder auch ausdifferenzierte Osteoblasten (Bruder und Fox 1999, Crane et al. 1995, Schieker et al. 2004). Welche Zellart sich für das Tissue Engineering von Knochen am besten eignet, ist bislang nicht sicher geklärt (Kneser et al. 2006). Bei der Isolation autogener Zellen aus dem Gewebe, der Vermehrung *in vitro* und der Reimplantation ergeben sich verschiedene Probleme der Zellkultur. Es ist schwierig, die physiologische Situation im Organismus auf die Zellkultur zu übertragen. So kann die Folge eine Dedifferenzierung und damit ein Funktionsverlust der Zellen sein (Minuth et al. 1998, Sittlinger et al. 1996, Von der Mark et al. 1977).

Eine andere Möglichkeit des Tissue Engineering ist die Applikation von Wachstumsfaktoren in das Gewebe mittels eines Trägermaterials. Diese implantierten Wachstumsfaktoren haben die Aufgabe, die Proliferation und Differenzierung der lokalen osteogenen Zellen und Vorläuferzellen anzuregen und so die Regeneration des Gewebes zu verbessern (Kneser et al. 2006).

Auf diese Strategie soll im Folgenden näher eingegangen werden, da sie in der vorliegenden Studie angewendet wurde.

1.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis und Synthese extrazellulärer Matrix beeinflussen und auf diese Weise die Entwicklung von Gewebe sowohl während der Embryonalphase, während des Wachstums als auch im adulten Organismus steuern (Giannobile 1996, Salgado et al. 2004). Sie werden von Zellen sezerniert und können autokrin, parakrin und endokrin wirken, was ihnen erlaubt, auf eine Vielzahl von Zellen zu wirken. Manche Wachstumsfaktoren werden in der extrazellulären Matrix gespeichert und während Remodeling- und Reparaturprozessen ausgeschüttet (Barnes et al. 1999, Schliephake 2002). Die Wirkung von Wachstumsfaktoren wird über die Bindung an die extrazelluläre Domäne von Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen vermittelt. Die intrazelluläre Domäne des Rezeptors stößt eine spezifische Signaltransduktionskaskade an, in deren Verlauf ein intrazelluläres Protein, der Transkriptionsfaktor, aktiviert wird, zum Nukleus wandert und dort letztlich die Expression neuer Gene induziert. Die Folge ist eine Veränderung der Eigenschaften der Zielzelle, was sowohl den Phänotyp als auch die Aktivität der Zielzelle betreffen kann. Die Art der Aktivierung, des Rezeptors und der Signaltransduktionskaskade variiert je nach Wachstumsfaktor oder Zielzelle (Barnes et al. 1999, Heldin et al. 1997, Kawabata et al. 1998, Massagué 1998, Rassow et al. 2008).

Es gibt eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und für eine mögliche klinische Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sind jene besonders interessant, welche an der Regeneration von Knochengewebe beteiligt sind (Schliephake 2010 a).

PDGF Platelet-derived growth factor (PDGF) ist ein dimeres Polypeptid, welches seine Wirkung auf spezifische Zielzellen über die Bindung an Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität entfaltet. Es wird aus Thrombozyten freigesetzt und wurde auch in hypertrophierenden Chondrozyten, Makrophagen und Osteoblasten nachgewiesen (Barnes et al. 1999). PDGF wirkt chemotaktisch und mitogen auf mesenchymale Vorläuferzellen. Auf diese Weise spielt das Polypeptid eine wichtige Rolle bei der Heilung und Regeneration von Knochen (Abdennagy et al. 1992, Barnes et al. 1999, Ross et al. 1986, Tanaka und Liang 1995).

In Verbindung mit Insulin-like growth factor (IGF) zeigt PDGF eine Verbesserung der Knochenregeneration im Bereich von Implantaten, konnte jedoch bei alleiniger Applikation kein signifikantes Knochenwachstum induzieren (Schliephake 2002).

bFGF Basic fibroblast growth factor (bFGF) gehört zur Gruppe der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Das Protein wird von Osteoblasten synthetisiert und in der Knochenmatrix gespeichert, von wo es bei Heilungsprozessen freigesetzt wird. Wie die anderen Mitglieder der FGF-Familie wirkt bFGF über Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität (Barnes et al. 1999, Globus et al. 1989, Wang 1996). bFGF besitzt sowohl mitogene Eigenschaften, indem es die Proliferation von mesenchymalen Zellen steigert, als auch eine angiogene Wirkung (Cornell und Lane 1992, Wang 1996). So stellte man eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen in der Umgebung von mit bFGF behandelten autogenen Transplantaten fest (Eppley et al. 1988).

bFGF hat zudem morphogene Eigenschaften inne, indem es auf die Differenzierung von Endo-

1 Einleitung

thelzellen und Chondrozyten Einfluss nimmt (Gospodarowicz 1991). bFGF scheint vor allem in der frühen Phase der Heilung den Knochenaufbau zu unterstützen (Inui et al. 1998, Kawaguchi et al. 1994).

IGF Insulin-like growth factor (IGF) kommt in zwei Isoformen vor: IGF-1 und IGF-2. IGF-1 wird im Bezug auf die Knochenheilung als wirksamer angesehen. Auch hier erfolgt die Signalübertragung über Tyrosin-Kinase Rezeptoren (Liebermann et al. 2002).

IGFs haben sowohl einen systemischen Effekt, der das embryonale und postnatale Wachstum betrifft, als auch einen lokalen Effekt, der bewirkt, dass die Proliferation von Zellen wie Osteoblasten, Chondroblasten und Fibroblasten verstärkt wird (Andrew et al. 1993, Schliephake 2010 a).

TGF- β Transforming growth factor β (TGF- β) gehört zur Gruppe von Proteinen, die als TGF- β -Superfamilie bezeichnet werden, die in Knochen, Thrombozyten und Knorpel zu finden sind. Sie wirken über Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren (Massagué 1996, 1998, Roberts und Sporn 1993, Robey et al. 1987). TGF- β Proteine sind in der Lage, verschiedene andere Zellen in Proliferation, Differenzierung und Bewegung zu beeinflussen (Ripamonti et al. 1997). Da sie sowohl Chondrozyten als auch Osteoblasten stimulieren, scheinen sie an allen Phasen der Knochenheilung beteiligt zu sein (Bostrom und Asnis 1998, Joyce et al. 1990, Robey et al. 1987).

VEGF Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Angiogenese während des embryonalen und postnatalen Wachstums und bei der Regeneration von Gewebe, indem es mitogen auf Endothelzellen wirkt (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Jedoch auch bei malignem Wachstum von Tumoren ist VEGF beteiligt, da es vermehrt in Tumorzellen produziert wird und es die Angiogenese des Tumorgewebes stimuliert (Ferrara und Davis-Smyth 1997, Ferrara et al. 2003). VEGF wird u.a. von Osteoblasten sezerniert (Mayr-Wohlfahrt et al. 2002). Ein Sauerstoffmangel im Gewebe führt zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF und damit zu einer spontanen Revaskularisierung eines ischämischen Gewebes (Ferrara und Davis-Smyth 1997).

VEGF beeinflusst entscheidend die Regeneration von Knochengewebe, indem es zum einen das Einwachsen neuer Blutgefäße reguliert. Diese Blutgefäße gewährleisten die Migration mesenchymaler Vorläuferzellen zum Ort der Regeneration, die sich weiter in Knochenzellen differenzieren können (Dai und Rabie 2007). Zum anderen wird eine direkte, positive Wirkung von VEGF auf Knochenzellen beschrieben, was die Wichtigkeit dieses Wachstumsfaktors im Zusammenhang mit der Regeneration von Knochengewebe weiter unterstreicht (Mayr-Wohlfahrt et al. 2002). Auch die Tatsache, dass durch BMP stimulierte Osteoblasten VEGF produzieren (Deckers et al. 2002) und dass bei Blockierung der Gefäßneubildung eine Knochenneubildung bzw. -heilung ausbleibt (Hausmann et al. 2001, Mori et al. 1998), zeigt die enge Verknüpfung von Angiogenese und Knochenregeneration. Die Verbesserung der Knochenregeneration durch lokale Freisetzung von VEGF konnte im Knochendefektmodell bereits nachgewiesen werden (Leach et al. 2006, Murphy et al. 2004). VEGF scheint besonders in der frühen Phase der Knochenheilung essentiell zu sein (Street et al. 2002).

1 Einleitung

BMP Bone morphogenetic protein (BMP) gehört zur TGF- β -Superfamilie und wirkt wie diese über Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Mittlerweile sind etwa 30 Moleküle dieses Wachstumsfaktors bekannt, doch scheinen im Zusammenhang mit Knochenheilung speziell drei Faktoren dieser Gruppe eine herausragende Rolle zu spielen. Diese sind BMP-2, -4 und -7 (Liebermann et al. 2002). Dabei hat sich BMP-2 als besonders effektiver Wachstumsfaktor zur Knocheninduktion herauskristallisiert (Arosarena und Collins 2005 b, Uludag et al. 2000).

Schon 1965 beschrieb Urist die ektope Knochenbildung in der Muskulatur von Ratten, die durch die Implantation von demineralisierter Knochenmatrix induziert wurde. Ursächlich für die Knochenneubildung war ein bestimmtes Protein, welches später *bone morphogenetic protein* (BMP) genannt wurde (Urist 1965, Urist et al. 1979, Urist und Strates 1971). 1988 entschlüsselten Wozney et al. die genetische Sequenz verschiedener Isoformen des BMP (Wozney et al. 1988). Dadurch ist es heute möglich, rekombinantes humanes BMP (rhBMP) gentechnologisch herzustellen.

Die Funktionen der BMPs sind sehr vielfältig, da sie einerseits die Organentwicklung während der embryonalen Wachstumsphase maßgeblich beeinflussen, aber auch, wie schon früh nachgewiesen, die Fähigkeit besitzen, mesenchymale Stammzellen zur Differenzierung in Osteoblasten anzuregen. Bei der Implantation von BMP-beladenen Trägern im Muskelgewebe migrieren perivaskuläre mesenchymale Zellen in den Bereich des Implantates, proliferieren und differenzieren sich in Knochenzellen. Auf diese Weise kommt es auch in ektopen Regionen zur Knochenneubildung (Barnes et al. 1999, Ducy et al. 2000, Uludag et al. 2000, Urist et al. 1983, Wozney 2002).

1.3.3 Trägermaterialien

Damit Wachstumsfaktoren die Knochenregeneration unterstützen und stimulieren können, ist eine Applikation mithilfe eines Trägers in den Knochendefekt notwendig, damit die Wachstumsfaktoren langsam und kontinuierlich über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden. Der Träger agiert in gewisser Weise als künstliche extrazelluläre Matrix und sollte bestimmten Kriterien gerecht werden.

Trägermaterialien sollten in erster Linie zeitweise eine mechanische und strukturelle Widerstandsfähigkeit gegen die Belastungen durch das umgebende Gewebe besitzen und gleichzeitig ein dreidimensionales Netzwerk aus miteinander verbundenen Poren aufweisen. Beide Eigenschaften sind notwendig für ein ungestörtes Einwachsen von Knochengewebe (Liu und Ma 2004, Sachlos und Czernuszka 2003, Salgado et al. 2004). Der Träger sollte außerdem biokompatibel und resorbierbar sein, im Idealfall kontrolliert und parallel zum Einwachsen des Gewebes abgebaut und letztlich durch dieses ersetzt werden (Hutmacher 2000, Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Dabei sind immunologische Reaktionen oder Fremdkörperreaktionen des Organismus unerwünscht, da entzündliche Prozesse die Knochenregeneration negativ beeinflussen können (Liu und Ma 2004). Eine weitere Eigenschaft, die den Träger von der reinen Funktion eines Gerüsts unterscheidet, ist, dass er mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor beladbar sein und diesen kontinuierlich und kontrolliert in die Umgebung abgeben sollte (Schliephake 2010 b).

Es kommen nun eine Vielzahl von Biomaterialien als Trägersubstanzen für das Tissue Engineering in Betracht. Dies sind u.a. Metalle oder auch Kalziumphosphatkeramiken. Der größte Nachteil

1 Einleitung

dieser anorganischen Materialien im Hinblick auf ihre Anwendung beim Tissue Engineering ist, dass sie im Gewebe verbleiben, nicht oder nur sehr langsam abgebaut werden und so auf lange Sicht nicht durch Knochen ersetzt werden können. Es besteht zudem die Gefahr einer entzündlichen Fremdkörperreaktion (Hench und Polak 2002, Livingston et al. 2002). Ein weiterer negativer Aspekt betrifft die Beladung mit Wachstumsfaktoren, die durch Adsorption an die Oberfläche erfolgt. Diese Art der Bindung beruht auf den gegensätzlichen Ladungen der Oberfläche des anorganischen Materials und des jeweiligen Proteins. Dies hat zur Folge, dass der Wachstumsfaktor zu schnell abgegeben wird und seine Wirkung nur zu Anfang während eines kurzen Zeitraums entfalten kann (Hall et al. 2007).

Im Gegensatz dazu bieten Polymere als Trägersubstanzen mehr Möglichkeiten, da man ihre Materialzusammensetzung besser verändern und gezielt an die Anforderungen anpassen kann (Burg et al. 2000, Hench und Polak 2002, Liu und Ma 2004). Man unterscheidet bei den Polymeren Naturpolymere und synthetisch Hergestellte. Bei den Naturpolymeren ist ein bekannter Vertreter das Kollagen, welches in seiner Funktion als Träger schon mehrfach erforscht wurde (Arosarena und Collins 2005 a, Boyne et al. 1997, Friess et al. 1999, Fujimura et al. 1995, Uludag et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass mit rhBMP-2 beladenes Kollagen die Knochenregeneration verbessert (Schliephake et al. 2008) und Knochenneubildung stimulieren kann (Uludag et al. 1999, Winn et al. 1999). In weiteren Studien hat man versucht, Kollagen in seinen pharmakokinetischen Eigenschaften zu modifizieren, um eine verzögerte Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu erzielen. Dies wurde erfolgreich für VEGF durchgeführt, indem man den Wachstumsfaktor an ins Kollagen inkorporiertes Heparin band (Steffens et al. 2004, Yao et al. 2006). Ein großer Nachteil des Kollagens ist jedoch die unzureichende mechanische Stabilität (Schieker et al. 2006) und das klinisch schwer einschätzbare Verhalten des Materials. Klinische Studien, in denen mit Wachstumsfaktoren versehene Kollagenträger zur Augmentation des Sinusbodens oder des Alveolarkamms nach Extraktion verwendet wurden, ergaben keine zuverlässigen Ergebnisse (Cochran et al. 2000, Groeneveld et al. 1999, Van den Bergh et al. 2000).

Polymere der Poly- α -Hydroxycarbonsäuren wie Polylaktid (PLA) oder Polyglycolsäure (PGA) sind die bekanntesten synthetischen polymeren Materialien und werden häufig im Tissue Engineering verwendet (Fialkov et al. 2003, Ishaug et al. 1997, Karp et al. 2003, Ma und Choi 2001, Peter et al. 1998). Die Eignung dieses Materials als Träger für BMP wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Boyan et al. 1999, Zegzula et al. 1997). Polylaktide werden durch Hydrolyse *in vivo* abgebaut. Dies bietet auf der einen Seite Vorteile, da ihr Abbauverhalten je nach Zusammensetzung des Materials und Kristallinität variiert und so gut steuerbar ist (Hollinger und Battistone 1986, Schliephake 2010 b, Whitaker et al. 2001). Des Weiteren ist es möglich, mithilfe von CO₂-Hochdruckbegasung (engl. *gas foaming*) Wachstumsfaktoren in das Polylaktidmaterial zu inkorporieren. Auf diese Weise erhält man eine kontrollierte Abgabe des Wirkstoffs über einen längeren Zeitraum. Dies konnte sowohl *in vitro* (Hile et al. 2000, Schiller et al. 2004, Schliephake et al. 2007, Whitaker et al. 2001) als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Gruber et al. 2009). Auf der anderen Seite können saure Zerfallsprodukte in der Umgebung des Polymer-Implantates zu einer verminderten Biokompatibilität führen und neu entstandenes Gewebe durch zytotoxische Wirkung beeinflussen (Salgado et al. 2004). So wird in einer Studie vermutet, dass es zu einer Fremdkörperreaktion durch eine Erniedrigung des pH-Wertes in der Umgebung von sich zersetzenden

1 Einleitung

Polylaktidimplantaten kommt (Gruber et al. 2009). Eine weitere Studie legt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die saure Degradation von Polylaktidimplantaten negativ auf die Osteoneogenese auswirkt (Schliephake et al. 2008). Eine Modifikation der Materialzusammensetzung des Polylaktids durch Zugabe von karbonhaltigem Kalziumphosphat ermöglicht eine Abpufferung der sauren Degradationsprodukte und verbessert auf diese Weise die Biokompatibilität des Polylaktidmaterials (Schiller et al. 2004).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aktuell noch kein Material gefunden wurde, welches allen Anforderungen an einen optimalen Träger für Wachstumsfaktoren gerecht wird. Enorm vielversprechend in seinen Möglichkeiten ist jedoch das Polylaktid, welches in zahlreichen, aktuellen Studien weiter erforscht wird.

1.4 Das ektope Tiermodell

Die Untersuchung verschiedener Tissue Engineering Konzepte kann auf unterschiedlichen Ebenen geschehen. Wie in anderen Forschungsgebieten erfolgen zunächst *in vitro* Experimente. Durch *in vitro* Tests von Biomaterialien ist ihre Charakterisierung hinsichtlich Toxizität, Biokompatibilität und Pharmakokinetik möglich. Anhand von *in vitro* Zellkulturen kann man Aussagen treffen über Zelldifferenzierung und -proliferation. *In vitro* Tests können sehr gut standardisiert und quantifiziert werden (Hanks et al. 1996, Pizzoferrato et al. 1994, Schiller et al. 2004, Schliephake et al. 2007).

Jedoch sind der *in vitro* Testung Grenzen gesetzt. So ist es nicht möglich, eine genaue Aussage über die Interaktion von Gewebe mit dem jeweiligen Biomaterial im lebenden Organismus zu treffen, da es sehr schwierig ist, die Dynamiken des lebenden Organismus *in vitro* zu simulieren. Beim Knochengewebe betrifft dies insbesondere die mechanischen Stimuli, denen Knochen *in vivo* ausgesetzt ist (Pearce et al. 2007, Sikavitsas et al. 2001).

Um eine genauere Bewertung von Materialien hinsichtlich ihrer Wirkung auf lebendes Gewebe zu erhalten, werden Tiermodelle herangezogen. Im Bereich des Tissue Engineering von Knochengewebe geschieht dies häufig mithilfe des sog. *critical size defect*. Dabei handelt es sich um einen künstlich gesetzten Knochendefekt im Tiermodell, der von selbst nicht ausheilt (Hollinger und Kleinschmidt 1990). Anhand solcher experimenteller Tiermodelle ist es möglich, zu untersuchen, ob bestimmte Tissue Engineering Strategien zu einer Heilung von Knochendefekten führen, ohne die es sonst zu keiner Heilung käme (Schliephake et al. 2008).

Demgegenüber steht das Tiermodell der „ektopen Knochenbildung“. Das Wort „ektop“ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet soviel wie „nach außen verlagert“ (Wermke et al. 2010). Die häufigsten verwendeten Modelle sind die chirurgische Implantation in subkutanen Gewebe, Muskelgewebe oder auch in die Kapsel der Niere (Scott et al. 2012). Es bietet die Möglichkeit, das osteoinduktive Potential von Biomaterialien und Wachstumsfaktoren isoliert und knochenmilieufreien zu erforschen (Salgado et al. 2004), da bestimmte Faktoren wie der Einfluss von Knochenzellen und knochenstimulierenden Zytokinen oder die knochenstimulierende Mechanotransduktion im Vergleich zum *critical size defect* keine oder nur eine geringe Rolle spielen (Scott et al. 2012). Zur Knochenneubildung müssen im ektope Tiermodell mesenchymale Vorläuferzellen zur Differenzierung angeregt werden. Beim intramuskulären, ektope Tiermodell liegt dabei im Vergleich zum subkutanen eine größere Menge an induzierbaren Vorläuferzellen vor (Scott et al. 2012). Obwohl sich diese Art des Tiermodells nur bedingt auf den humanen Organismus übertragen lässt, bietet es die einzigartige Möglichkeit, die Osteoinduktivität eines mit Wachstumsfaktoren bestückten Trägersystems isoliert und *in vivo* quantitativ und qualitativ zu erforschen.

1.5 Zusammenfassung und Fragestellung

Mit dem anspruchsvollen Ziel der *restitutio ad integrum* bedeuten größere Knochendefekte, wie sie z.B. nach Tumorresektionen oder schwerwiegenden Frakturen entstehen, für den Chirurgen weiterhin eine schwierige Herausforderung.

Trotz der Vielzahl an künstlich hergestellten Knochenersatzmaterialien, die mittlerweile zur Verfügung stehen, ist das autologe Knochentransplantat nach wie vor der „Goldstandard“ in der Behandlung komplexer klinischer Fälle (Gazdag et al. 1995, Moore et al. 2001, St John et al. 2003). Da die Entnahmeoperation zur Gewinnung autologen Knochens zur Defektdeckung eine nicht zu vernachlässigende Zusatzbelastung und ein Risiko für den Patienten darstellt (Goulet et al. 1997, Joshi und Kostakis 2004, Kessler et al. 2005), ist man bemüht, andere Möglichkeiten der Behandlung von Knochendefekten zu finden.

Neue Perspektiven eröffnet hier das Tissue Engineering und ist daher Gegenstand zahlreicher, aktueller Studien. Bei den Wachstumsfaktor-basierten Forschungsansätzen hat sich rhBMP-2 als wirksamer Faktor sowohl zur ektopen (Gruber et al. 2009) als auch zur orthotopen (Schliephake et al. 2008) Knochenneubildung herausgestellt. Aber auch VEGF spielt eine zentrale Rolle in der Regeneration von Knochengewebe (Leach et al. 2006, Murphy et al. 2004).

Ein geeignetes Trägermaterial scheint das Polylaktid zu sein, welches sowohl den mechanischen Ansprüchen an ein Trägermaterial genügt, als auch eine kontrollierte Freisetzungskinetik zeigt (Boyan et al. 1999, Hile et al. 2000, Zegzula et al. 1997). Eine Modifikation des Materials durch Beimengung von Kalziumkarbonat kann die Defizite im Degradationsverhalten hinsichtlich der Biokompatibilität ausgleichen (Schiller et al. 2004).

Gegenstand dieser Arbeit ist nun die Frage, ob die kombinierte Freisetzung von rhBMP-2 und VEGF in einer ektopen Region der Ratte zu einer qualitativ und quantitativ verbesserten Knochenneubildung im Vergleich zur isolierten Freisetzung von rhBMP-2 führt und ob sich rhBMP-2 durch die kombinierte Gabe mit VEGF einsparen lässt.

Zudem soll überprüft werden, inwiefern sich die verzögerte Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den durch CO₂-Hochdruckbegasung hergestellten Polylaktidträgern vorteilhaft auf die Knochenneubildung auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Histologische Aufbereitung und Auswertung

Einbettform	
Polyäthylen 25 mm	Heraeus-Kulzer GmbH, Hanau
Exsikkator	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Gefäße	
Becherglas	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Glasbehälter für Färbung	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Weithalsflasche Braunglas 500 ml	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main
Klebstoff	
Loctite 420 Sofortklebstoff, kapillar	Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf
Kühlschränke	
Liebherr Glassline	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Sanyo Tiefkühlschrank	Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf
Magnetrührer	
RCT basic IKAMAG®	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskopiersystem dotSlide 2.0 Virtual Slide System	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Objektträger	
Plexiglasobjektträger 25x75x2 mm	Patho-service GmbH, Oststeinbeck
Säge	
Präzisions-Diamantband-Trennsystem	EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt
Sägeblatt	
Diamanttrennband	Patho-service GmbH, Oststeinbeck
Schleif- und Poliermaschinen	
LaboPol -4/-5/-6, einspindelrig	Struers GmbH, Willich
Tellerschleifgerät „EXAKT-Schleifsystem“	EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt

Schleifpapiere

Siliziumcarbid-Papier, Körnung 80-4000
Siliziumcarbid-Schleifpapier „WS Flex 18C“,
Körnung P400-P1200

Struers GmbH, Willich

Hermes Schleifmittel GmbH & Co.KG,
Hamburg

Wärmeschrank

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Histologische Aufbereitung

Alizarinrot S

Merck KGaA, Darmstadt

Aqua dest.

Centramed, Koblenz

Ethanol

CVH Chemie-Vertrieb GmbH & Co.
Hannover KG

Formaldehydlösung 37%

CVH Chemie-Vertrieb GmbH & Co.
Hannover KG

Löfflers Methylenblaulösung

Merck KGaA, Darmstadt

m-Xylol

Merck KGaA, Darmstadt

Salzsäure HCl

Merck KGaA, Darmstadt

Technovit® 9100

Heraeus-Kulzer GmbH, Wehrheim

2.3 Software

Photoshop CS5

Adobe Systems GmbH, München

OpenOffice

Apache Software Foundation

Scannersoftware

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

2.4 Polylaktidträger

2.4.1 Materialzusammensetzung u. -herstellung

Die in dieser Studie verwendeten Implantate setzten sich aus den Komponenten Poly-DL-laktid (PDLLA) (Boehringer, Ingelheim) und Kalziumkarbonat (Schaefer Kalk GmbH & Co. KG, Diez) zusammen (Abbildung 2.1). Polylaktide sind biodegradierbare bzw. bioresorbierbare Polymere aus Milchsäure-Molekülen, die *in vivo* in ihre Bestandteile Milchsäure und Wasser durch Hydrolyse der Esterbindungen zerfallen und vom Organismus metabolisiert werden. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer pH-Wert-Absenkung durch saure Degradationsprodukte, die durch Zugabe des Füllstoffes Kalziumkarbonat jedoch erfolgreich abgepuffert werden können (Schiller et al. 2004). Die Herstellung des Kompositmaterials aus PDLLA und Kalziumkarbonat erfolgte durch ein lösungsmittelfreies und trockenes, mechanisches Verfahren. Dabei wurden 16 g granuliertes Poly-DL-laktid (Korngröße durchschnittlich 3000 μm) und 4 g Kalziumkarbonatkristalle (Kristallgröße durchschnittlich 12 μm) in einer Feinprallmühle (NHS-0, Tokyo 143, Japan) bei 5000 bis 16000 Umdrehungen pro Minute gemischt und verarbeitet. Die Partikelgröße des fertigen Kompositmaterials lag bei 200 bis 400 μm (Schliephake et al. 2015).

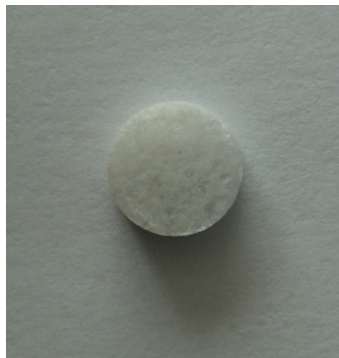


Abbildung 2.1: Polylaktidimplantat

2.4.2 Beladung mit Wachstumsfaktoren

Zur Herstellung der fertigen Implantate wurde das granuliertes Kompositmaterial aus Kalziumkarbonat und PDLLA mit einer wässrigen Lösung aus rhBMP-2 bzw. VEGF gemischt. Es folgte die Gefriertrocknung (Lyophilisierung) des Gemisches und die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Implantate wurden in speziellen Platten aus Polytetrafluorethylen (PTFE), die Mulden von 8 mm Durchmesser und 3 mm Dicke enthielten, hergestellt (Abbildung 2.2).

2 Material und Methoden

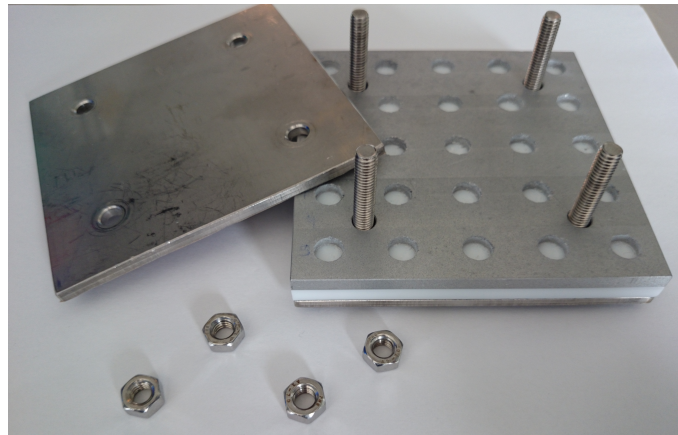


Abbildung 2.2: PTFE-Form

Dazu wurde jede Mulde mit 0,06 g des Polylaktid-Wachstumsfaktor-Gemisches gefüllt und einer CO₂-Hochdruckbegasung von 100 bar über 2 Stunden ausgesetzt. Die Hochdruckbegasung führt dazu, dass sich das Polylaktid bei einer Temperatur von etwa 35 °C verflüssigt und der jeweilige Wachstumsfaktor ins Polymer inkorporiert wird (Schiller et al. 2004, Schliephake et al. 2007).

Beim rhBMP-2 wurden die Konzentrationen 24 µg, 48 µg und 96 µg, beim VEGF die Konzentrationen 0,24 µg, 1,5 µg und 6 µg verwendet. Das Kombinationspräparat aus VEGF und rhBMP-2 wurde in den Konzentrationskombinationen 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP (1,5 + 24 µg), 6 µg VEGF und 24 µg BMP (6 + 24 µg), 1,5 µg VEGF und 48 µg BMP (1,5 + 48 µg) und 6 µg VEGF und 48 µg BMP (6 + 48 µg) hergestellt.

2.5 Versuchstiere

2.5.1 Tierversuchsgenehmigung

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Versuchsvorhaben wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-10/0223 am 03.12.2010 genehmigt.

2.5.2 Herkunft und Haltung

Für die Studie wurden insgesamt 132 männliche Wistar-Ratten (*rattus norvegicus*) verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, sowie Harlan Laboratories GmbH, Deutschland, bezogen und hatten durchschnittlich ein Gewicht von 300 g.

Sie wurden in Makrolonkäfigen des Typ IV in Dreiergruppen bei 20-24 °C in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Die Tiere hatten einen 12 Stunden Schlaf-Wach-Rhythmus, die Luftfeuchtigkeit betrug zwischen 50 und 60%. Einmal wöchentlich wurden die Käfige mit Einstreu Lignocel[®] Select (J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg) versehen. Gefüttert wurden die Tiere ad libitum mit Haltungsfutter für tierexperimentelle Forschung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Auch die Trinkwasserversorgung erfolgte ad libitum mit normalem Leitungswasser.

2.5.3 Versuchsplanung

Die Ratten wurden in Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt. Jedem Tier aus der jeweiligen Gruppe wurde sowohl ein durch intraoperatives Auftropfen als auch durch CO₂-Hochdruckbegasung beladener Polylaktidträger der gleichen Konzentrationsstufe seitengetrent in die Glutealmuskulatur implantiert. Es wurden die Beobachtungsintervalle 4 und 13 Wochen gewählt. Für jedes Beobachtungsintervall wurde eine separate Kontrollgruppe zu je 6 Tieren mitgeführt. Bei diesen Tieren wurde jeweils seitengetrent eine *sham*-Operation durchgeführt und ein unbeladener Polylaktidträger implantiert (Tabelle 2.1 und Kapitel 2.6.2).

2 Material und Methoden

Konzentrationsstufe/- kombination	Beobachtungsintervall	
	4 Wochen	13 Wochen
24 µg BMP	n = 6	n = 6
48 µg BMP	n = 6	n = 6
96 µg BMP	n = 6	n = 6
0,24 µg VEGF	n = 6	n = 6
1,5 µg VEGF	n = 6	n = 6
6 µg VEGF	n = 6	n = 6
1,5 + 24 µg	n = 6	n = 6
6 + 24 µg	n = 6	n = 6
1,5 + 48 µg	n = 6	n = 6
6 + 48 µg	n = 6	n = 6
Kontrollgruppe	n = 6	n = 6

Tabelle 2.1: Konzentrationsstufen/-kombinationen, Beobachtungsintervalle, Anzahl der Versuchstiere

2.6 Operatives Vorgehen

2.6.1 Narkoseverfahren

Nach Einleiten der Narkose mittels CO₂ wurden die Tiere zunächst gewogen, um gewichtsadaptiert und simultan Medetomidin (Domitor[®]) und Ketamin (Ketamin 10%[®]) rechtsseitig intraperitoneal verabreichen zu können. Hierzu wurde eine Lösung aus 0,3 ml Domitor und 0,7 ml Ketamin hergestellt. Die Tiere erhielten 1 ml Injektionslösung/kg Körpergewicht i.p..

Antagonisiert wurde die Narkose mittels Atipamezol (Antisedan[®]) in der Dosierung 0,2 ml/kg Körpergewicht s.c..

2.6.2 Operation der Tiere

Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Auslösen eines Schmerzreizes im Interdigitalraum wurde der Rücken der Tiere im Bereich des Glutealmuskels rasiert und die Augen mit Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe abgedeckt.

Die Tiere wurden für die Präparation einer Muskeltasche in Bauchlage auf Wärmematten gelagert. Nun wurde zunächst eine Hautinzision ca. 1 cm rechtsseitig, lateral der Wirbelsäule durchgeführt und die gluteale Muskulatur so präpariert, dass der Polylaktidträger eingebracht werden konnte. Je nach Gruppe folgte das direkte Auftropfen der Wachstumsfaktorlösung auf den Scaffold oder es wurde eine *sham*-Operation vollzogen, sodass die präparierte Muskeltasche leer blieb. Unmittelbar danach wurde die Implantationsstelle durch eine Muskelnahrt mit 4/0 Prolene[®] Nahtmaterial (Johnson & Johnson Medical GmbH „Ethicon“, Norderstedt) markiert und der kutane Wundverschluss mit 4/0 Vicryl[®] Nahtmaterial (Johnson & Johnson Medical GmbH „Ethicon“, Norderstedt) durchgeführt. Auf der linken Seite wurde analog zur rechten Seite vorgegangen, wobei hier jeweils ein Polylaktidträger mit inkorporierten Wachstumsfaktoren oder in den Kontrollgruppen ein unbeladener Polylaktidträger eingebracht wurde. Die Markierung der Implantationsstelle und der Wundverschluss erfolgten wie auf der Gegenseite. Der Polylaktidträger wurde parallel zur Hautoberfläche des Tieres eingebracht (Abbildung 2.3).

Die Operation wurde mit der subkutanen Implantation eines *radio frequency identification* (RFID)-Transponders im Nackenbereich zur eindeutigen Identifikation des Tieres abgeschlossen.



Abbildung 2.3: Einbringen des Polylaktidträgers

2.6.3 Prä- und postoperative Analgesie

2 Tage präoperativ bis 14 Tage postoperativ bekamen die Tiere Metapyrintrinkwasser zur Analgesie. Dazu wurde 1 Liter Trinkwasser mit 3 ml Metamizol-Injektionslösung (Metapyrin[®]) versetzt. Die weitere analgetische Abdeckung der Tiere erfolgte durch Buprenorphin-Ampullen (Temgesic[®]). Die fertige Injektionslösung enthielt 1 ml Buprenorphin und 2 ml NaCl. Die Tiere bekamen 0,2 ml Injektionslösung/kg Körpergewicht s.c. am OP-Tag und ein bzw. 2 Tage postoperativ 2 mal täglich verabreicht. Desweiteren erhielten die Tiere am 3. bis 5. Tag postoperativ einmal täglich s.c. Carprofen-Injektionslösung (Rimadyl[®]), die im Verhältnis 1:10 mit NaCl-Lösung verdünnt wurde. Hier lag die Dosierung bei 1 ml Injektionslösung (Carprofen+NaCl)/kg Körpergewicht.

2.6.4 Entnahme der Präparate

Die Tiere wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten (4 Wochen und 13 Wochen) mittels CO₂-Gas eingeschläfert. Zunächst wurde der subkutane Transponder im Nackenbereich zur eindeutigen Identifikation des Tieres entfernt. Es folgte die beidseitige subkutane Präparation der jeweiligen Stellen lateral der Wirbelsäule im Bereich der glutealen Muskulatur. Nach Auffinden des Markierungsfadens wurde das Polylaktidimplantat vollständig mit benachbarten Muskelanteilen und ggf. Knochenanteilen exzidiert und in einem beschrifteten Plastikbehälter in 4%ige Formalinlösung gegeben.

2.7 Einbetten und Anfertigung der Schliﬀpräparate

Die verwandten Lösungen wurden nach Vorschrift entsprechend der Gebrauchsinformation für Technovit® 9100 hergestellt und eingesetzt.

Folgende Systemkomponenten enthält Technovit® 9100:

- Basislösung, stabilisiert
- PMMA-Pulver
- Härter 1
- Härter 2
- Polymerisationsregler
- PMMA-Granulat (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt)

2.7.1 Vorbehandlung des Gewebes

Fixation Das Gewebe wurde zunächst für eine Woche in 4%iger, neutral phosphat-gepufferter Formalinlösung fixiert. Einmal täglich wurde im Exsikkator ein Vakuum erzeugt. Das Formalin wurde vor der Weiterverarbeitung der Präparate 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen.

Entwässerung, Intermedium und Immersion Die Dehydratation bzw. Entwässerung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei Raumtemperatur für jeweils 24 Stunden durchgeführt. Es folgte das Einlegen in Xylol als Intermedium in 3 Stufen für jeweils 24 Stunden. Die Phase der Immersion gliederte sich in Präinfiltration 1 und 2, Präinfiltrationslösung 1 und 2 und Infiltrationslösungen 1 bis 3, wobei für jede Phase die dazugehörige Lösung in eine dafür vorgesehene 500 ml Schott Weithalsflasche gefüllt wurde, um die Proben nach Abtropfen ein Glas weiterzusetzen. Die Lösungen wurden regelmäßig erneuert. Die Schritte dieser Phase der Vorbehandlung wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt (Technovit® 9100):

Phase	Lösung(en)
Entwässerung 1	Ethanol 70% für 24 Stunden
Entwässerung 2	Ethanol 70% für 24 Stunden
Entwässerung 3	Ethanol 90% für 24 Stunden
Entwässerung 4	Ethanol 96% für 24 Stunden
Entwässerung 5	Ethanol 96% für 24 Stunden
Entwässerung 6	Ethanol abs. für 24 Stunden
Entwässerung 7	Ethanol abs. für 24 Stunden
Entwässerung 8	Ethanol abs. für 24 Stunden
Intermedium 1	Xylol für 24 Stunden

2 Material und Methoden

Intermedium 2	Xylol für 24 Stunden
Intermedium 3	Xylol für 24 Stunden
Präinfiltration 1	Xylol/Basislösung, stab. (Verhältnis 50:50) für 24 Stunden
Präinfiltration 2	Basislösung, entstab. für 24 Stunden
Präinfiltrationslösung 1	Basislösung, entstab. + Härter 1
Präinfiltrationslösung 2	Basislösung, entstab. + Härter 1
Infiltrationslösung 1	Basislösung, entstab. + Härter 1 + PMMA-Pulver für mind. 24 Stunden
Infiltrationslösung 2	Basislösung, entstab. + Härter 1 + PMMA-Pulver für mind. 24 Stunden
Infiltrationslösung 3	Basislösung, entstab. + Härter 1 + PMMA-Pulver für mind. 24 Stunden

Tabelle 2.2: Entwässerung, Intermedium und Immersion

2.7.2 Polymerisation

Zur Polymerisation wurden die Stammlösungen A und B unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 zu 1 in einem Becherglas mithilfe eines Magnetrührers angemischt. Nach Einlegen der Präparate in die zylindrischen Polyäthylen-Einbettformen folgte die Auffüllung mit dem Polymerisationsgemisch bis zu 3/4 und anschließend die Evakuierung für 5-10 Minuten im Exsikkator. Die Präparate wurden so ausgerichtet, dass die dorsale bzw. ventrale Seite des Präparates jeweils zur kreisrunden Oberfläche des Zylinders wies. Die Einbettform wurde luftdicht verschlossen und für 2-3 Tage im Tiefkühlschrank bei -8 °C gelagert. Nach Aushärtung und Ausbettung der Kunststoffblöcke wurden sie für weitere 5 Stunden im Kühlschrank bei +5 °C belassen.

2.7.3 Anfertigung der Trenn-Dünnschliff-Präparate

Zunächst wurden die Kunststoffblöcke grob zugeschnitten und dabei der inhaltlose Teil des Zylinders abgetrennt. Der zweite, parallel zur Achse des Zylinders ausgerichtete Sägeschnitt erfolgte kurz vor dem größten Durchmesser (8 mm) des Polylaktidträgers.

Für alle Sägeschnitte wurde eine Säge mit Diamantsägeblatt der Firma EXAKT, Norderstedt, benutzt. Die weiteren Arbeitsschritte beinhalteten das Planschleifen der zugeschnittenen Kunststoffblocks mit dem Schleifgerät LaboPol, das Aufkleben auf Objektträger mit Loctite Sofortklebstoff, das erneute Sägen und schließlich das schrittweise Dünnschleifen und Polieren der Schliffpräparate mit dem EXAKT-Schleifsystem. Dazu wurde Schleifpapier von zunehmend feinerer Körnung gewählt und die Stärke des Schliffes immer wieder manuell überprüft. Die fertigen Schliffpräparate hatten eine Stärke von 20-25 µm.

2.8 Färbung

Zur Färbung der Schliﬀpräparate wurde die Methylenblau-Alizarinrot-Färbung nach Smith-Karagianes angewandt (Smith und Karagianes 1974).

Die Alizarinrotfärbelösung wurde mit 0,5 g Alizarinrot in 45 ml bidestilliertem Wasser angesetzt und der pH-Wert der Lösung auf 6,0-6,3 eingestellt.

Die Methylenblaulösung nach Löffler wurde vor Benutzung im Wärmeschrank auf 80 °C erhitzt. Die Gewebeschliffe wurden dann 30 Sekunden in die Methylenblaulösung eingetaucht, gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach folgte die Färbung mit Alizarinrot für 1-1,5 Minuten bei Raumtemperatur. Es schlossen sich die Spülung der Objektträger mit destilliertem Wasser und die Lufttrocknung bei Zimmertemperatur an.

Für jedes Gewebepreparat entstand ein nach Smith-Karagianes gefärbtes Schliﬀpräparat.

In der Methylenblau-Alizarinrot-Färbung nach Smith-Karagianes erscheint kalzifizierter Knochen orangerot, Kollagen dunkelblau und sonstiges Weichgewebe hellblau.

2.9 Mikroskopische Untersuchung

2.9.1 Bildgebung

Zur Erstellung der digitalen Bilder der nach Smith-Karagianes gefärbten Präparate wurde das Mikroskopie- und Scansystem *dotSlide 2.0 Virtual Slide System* der Firma Olympus verwendet (Abbildung 2.4).

Es besteht aus einem Mikroskop, einer digitalen Kamera und einem Barcode-Scanner. Das System ist mit einem Computer verbunden und ermöglicht die automatische Umwandlung histologischer Präparate in digitale Bilder. Nach manueller Bestückung des Scanners mit Schnittpräparaten ist das System in der Lage, diese selbstständig unter das Mikroskop zu legen und abzuscannen.

Bei der gewählten 100-fachen Vergrößerung entstanden Bilder mit einer Auflösung von durchschnittlich 7664 x 11208 Pixel.



Abbildung 2.4: Mikroskopiersystem dotSlide 2.0 Virtual Slide System (Bild mit freundlicher Genehmigung von Olympus Europa SE & Co. KG)

2.9.2 Bildbearbeitung und -auswertung

Die digitalen Bilder wurden mit dem Computerprogramm Photoshop der Firma Adobe histomorphometrisch ausgewertet. Dabei wurde in einem ersten Schritt die *region of interest* festgelegt, d.h. der Bereich des gesamten Polylaktidträgers im Muskel markiert, ausgeschnitten und die Pixelzahl dieser Fläche als Gesamtfläche festgehalten. In einem zweiten Schritt wurden nun alle Areale neu gebildeten Knochens, der sich in der Färbung orangerot darstellt, über die Farbähnlichkeit markiert und abermals die Pixelzahl festgehalten (Abbildung 2.5). So konnte der prozentuale Anteil neu gebildeten Knochens an der Gesamtfläche des angeschnittenen Polylaktidträgers ermittelt werden. Fälschlich markierte Artefakte wurden manuell aus der Markierung entfernt.

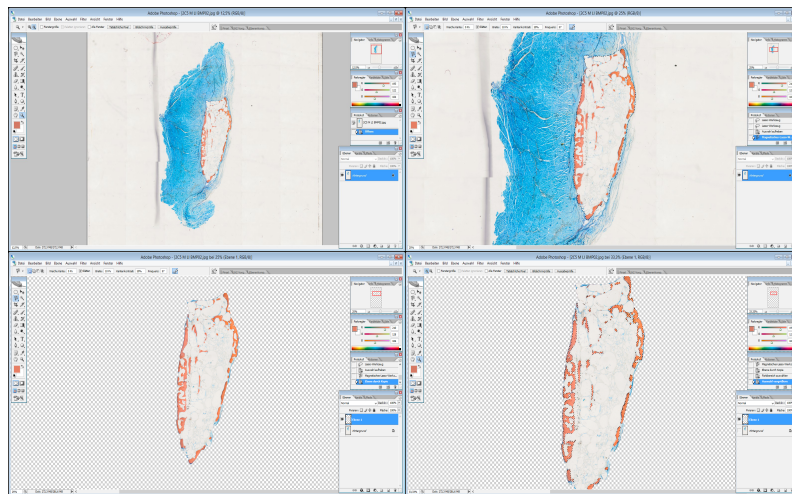


Abbildung 2.5: Bildbearbeitung und -auswertung: Markierung und Ausschneiden des Polylaktidträgers; Markierung aller Areale neu gebildeten Knochens

2.10 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Programm OpenOffice bestimmt. Das Datenmaterial bildeten die prozentualen Werte des Flächenanteils an neu gebildetem Knochen an der Gesamtfläche des angeschnittenen Polylaktidträgers. Zum Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen miteinander wurde die statistische Methode der *repeated measure ANOVA* angewendet. Die p-Werte wurden adjustiert nach der Bonferroni-Methode. Das Signifikanzniveau wurde mit p-Werten $\leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 rhBMP-2

3.1.1 rhBMP-2 inkorporiert

Histologische Ergebnisse Nach 4 Wochen war in der 24 μg -Konzentrationsgruppe eine minimale Knochenneubildung zu erkennen. Der Knochen bildete am Rand des Polylaktidträgers einen schmalen Saum, wobei auch kleine Knochenareale innerhalb des Trägers zu finden waren. Der Polylaktidträger war deutlich erkennbar. Es war nahezu kein Weichgewebe in den Träger eingewachsen (Abbildung 3.1).

Nach 4 Wochen zeigten sich in der 48 μg -Konzentrationsgruppe sowohl am Rand als auch im Inneren des Scaffolds neu gebildete Knochenareale, die teilweise trabekuläre Formen aufwiesen (Abbildung 3.2).

In der 96 μg -Konzentrationsgruppe war nach 4 Wochen deutlich Knochen auszumachen. Der Knochen hatte sich am Rand des Trägers manschettenartig neu gebildet und es penetrierte kein Weichgewebe in das Polylaktidmaterial. Vereinzelt waren auch hier kleine Knochenareale innerhalb des Trägers auszumachen (Abbildung 3.3).

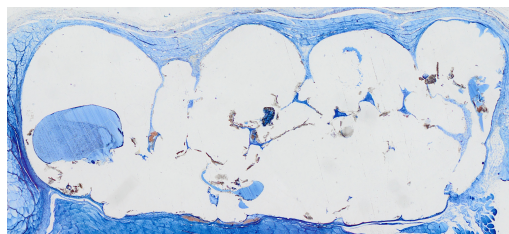


Abbildung 3.1: Polylaktidträger mit 24 μg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen

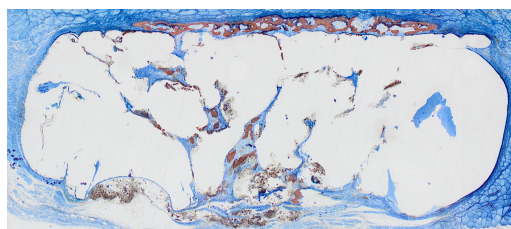


Abbildung 3.2: Polylaktidträger mit 48 μg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

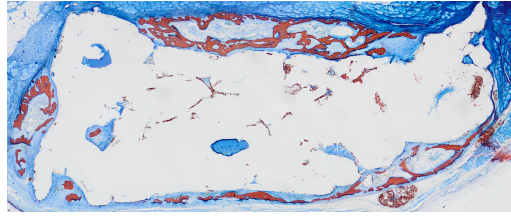


Abbildung 3.3: Polylaktidträger mit 96 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen

Nach 13 Wochen zeigte sich in der 24 µg-Konzentrationsgruppe eine im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Wochen deutlichere Knochenneubildung. Diese war sowohl randständig als auch im Inneren des Polylaktidträgers zu erkennen (Abbildung 3.4).

Nach 13 Wochen war in der 48 µg-Konzentrationsgruppe im Vergleich zum früheren Zeitpunkt dichteres, neu gebildetes Knochengewebe auszumachen. Auch nach 13 Wochen lag der Polylaktidträger stabil im Muskelgewebe (Abbildung 3.5).

In einem Schliffpräparat der 96 µg-Konzentrationsgruppe sah man nach 13 Wochen ausgeprägte Areale neu gebildeten Knochens innerhalb und am Rand des Trägers, die trabekuläre Formen aufwiesen (Abbildung 3.6).

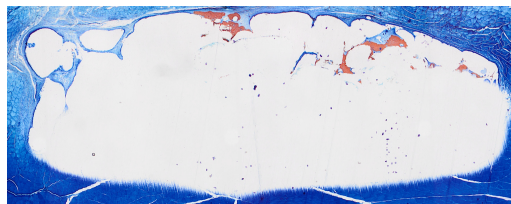


Abbildung 3.4: Polylaktidträger mit 24 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen

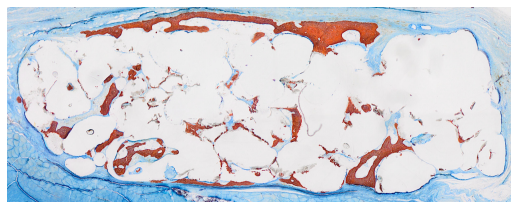


Abbildung 3.5: Polylaktidträger mit 48 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen

3 Ergebnisse

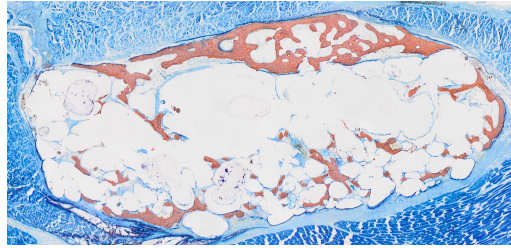


Abbildung 3.6: Polylaktidträger mit 96 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen

Histomorphometrie Die 24 µg-Konzentrationsgruppe zeigte nach 4 Wochen eine Knochenneubildung von 0,68%. In der 48 µg- und 96 µg-Konzentrationsgruppe kam es zu einer Knochenneubildung von 5,53% bzw. 5,57%. Dabei war der Unterschied zwischen 24 µg und 96 µg signifikant ($p = 0,0006$). Nach 13 Wochen stieg die Knochenneubildung in der 24 µg-Gruppe auf 6,32%, in der 48 µg-Gruppe auf 11,69% und in der 96 µg-Gruppe auf 12,87%, wobei der Unterschied in der Knochenneubildung zwischen 24 µg und 96 µg sehr nah am Signifikanzniveau lag ($p = 0,0567$). Die 96 µg-Konzentrationsgruppe zeigte die höchste Knochenneubildung (Abbildung 3.7).

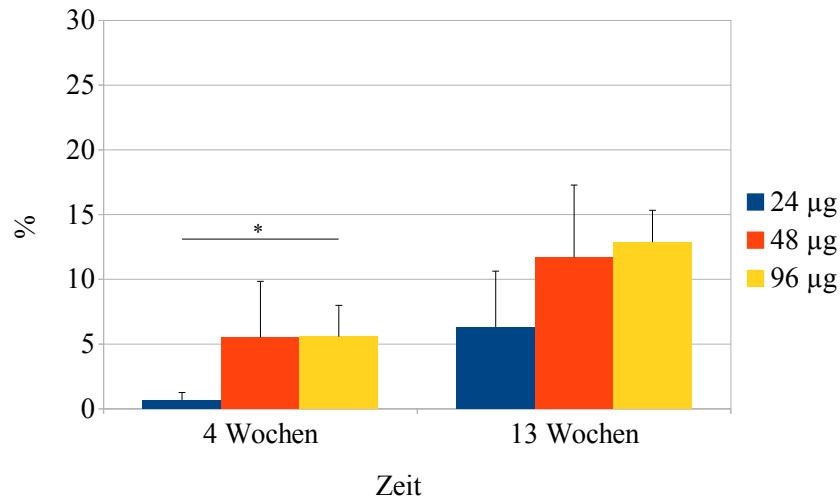


Abbildung 3.7: Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit inkorporiertem rhBMP-2

3.1.2 rhBMP-2 aufgetropft

Histologische Ergebnisse In der 24 µg-Konzentrationsgruppe mit aufgetropftem rhBMP-2 zeigten sich vereinzelt Knocheninseln im Muskelgewebe außerhalb des deutlich erkennbaren Polylaktidimplantates (Abbildung 3.8).

Nach 4 Wochen erkannte man in einem Schliffpräparat der 48 µg-Konzentrationsgruppe mit aufgetropftem rhBMP-2 leichte, randständige Areale neu gebildeten Knochens, die keinen Kontakt mit dem Polylaktidmaterial aufwiesen. Vereinzelt war auch Knochen innerhalb des Trägers auszumachen. Der Polylaktidträger war gut im Weichgewebe zu erkennen (Abbildung 3.9).

Auch in der 96 µg-Gruppe bildete sich der Knochen nach 4 Wochen am Rand des Polylaktidträgers. Der Knochen schien sich jedoch hier mehr ins Muskelgewebe auszudehnen. Dies war besonders an den Enden des Polylaktidträgers zu beobachten, wo der neu gebildete Knochen kappenartige Formen ausbildete (Abbildung 3.10).

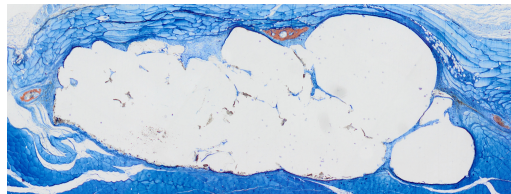


Abbildung 3.8: Polylaktidträger mit 24 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen

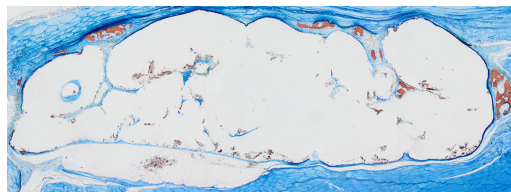


Abbildung 3.9: Polylaktidträger mit 48 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen

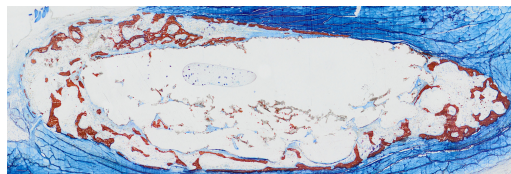


Abbildung 3.10: Polylaktidträger mit 96 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

Nach 13 Wochen hatten sich in der 24 µg-Konzentrationsgruppe mehrere Knochenareale neu gebildet, die jedoch mehrheitlich am Rand des Polylaktidträgers im umliegenden Weichgewebe lokalisiert waren. An diversen Stellen war das Polylaktidmaterial mit Weichgewebe durchsetzt (Abbildung 3.11).

In einem Schliffpräparat der 48 µg-Konzentrationsgruppe hatte sich nach 13 Wochen an den kurzen Enden des Polylaktidträgers Knochen neu gebildet, der sich in das benachbarte Muskelgewebe ausdehnte. An der Längsseite des Trägers war ein schmaler Knochensaum zu erkennen, der wie die übrigen Knochenareale keinen Kontakt zum Trägermaterial besaß (Abbildung 3.12).

Nach 13 Wochen erkannte man in einem Präparat der 96 µg-Konzentrationsgruppe deutlich Knochen trabekel, die sich mehrheitlich im umliegenden Weichgewebe befanden. Innerhalb des Polylaktidimplantates war kaum neu gebildeter Knochen auszumachen (Abbildung 3.13).

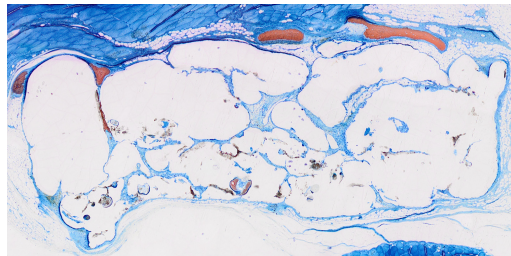


Abbildung 3.11: Polylaktidträger mit 24 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen

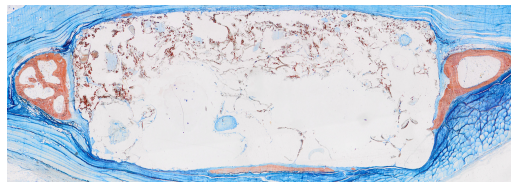


Abbildung 3.12: Polylaktidträger mit 48 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen

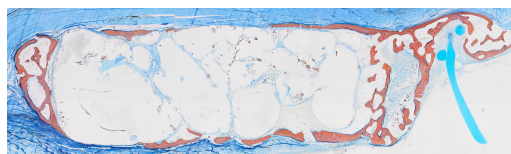


Abbildung 3.13: Polylaktidträger mit 96 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen

3 Ergebnisse

Histomorphometrie In den Gruppen mit aufgetropftem rhBMP-2 zeigte sich nach 4 Wochen in der niedrigsten Konzentrationsgruppe eine Knochenneubildung von 0,74%. Bei 48 µg rhBMP-2 und 96 µg rhBMP-2 war eine Knochenneubildung von 2,65% bzw. 9,09% zu verzeichnen. Signifikant waren die Unterschiede zwischen der 24 µg- und 96 µg-Konzentrationsgruppe ($p < 0,0001$) und der 48 µg- und 96 µg-Konzentrationsgruppe ($p = 0,0019$).

Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte die 24 µg-Gruppe nach 13 Wochen eine Zunahme auf 2,72%. Auch bei der 48 µg- und bei der 96 µg-Konzentrationsgruppe war über die Zeit eine zunehmende Knochenneubildung zu verzeichnen. In der 48 µg-Konzentrationsgruppe kam es nach 13 Wochen zu einer Erhöhung auf 6,67% und in der 96 µg-Gruppe betrug die Knochenneubildung nach 13 Wochen 15,83%. Nach 13 Wochen unterschieden sich die Knochenneubildungen der Gruppen 24 µg rhBMP-2 und 96 µg rhBMP-2 signifikant voneinander ($p = 0,0177$) (Abbildung 3.14).

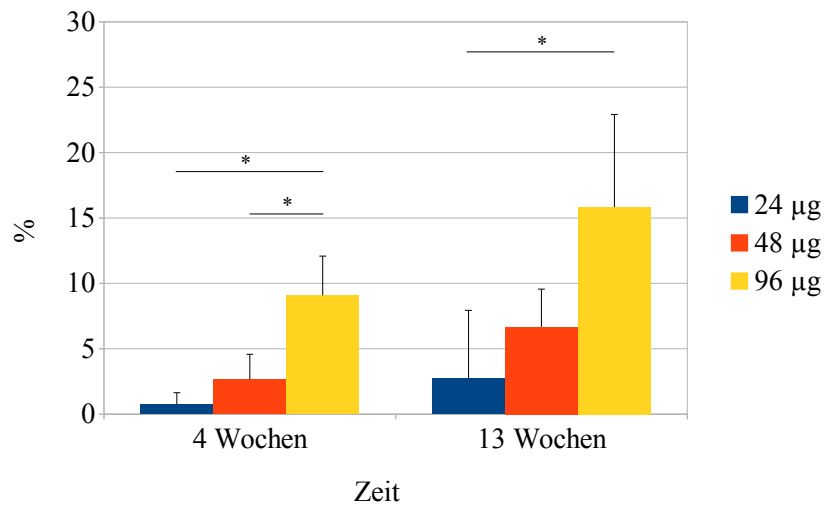


Abbildung 3.14: Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit aufgetropftem rhBMP-2

3.2 VEGF

3.2.1 VEGF inkorporiert

Histologische Ergebnisse In einem Schliffpräparat der 0,24 µg-Konzentrationsgruppe nach 4 Wochen war der Polylaktidträger gut im Muskelgewebe zu erkennen. Es hatte sich keinerlei Knochengewebe neu gebildet. Leicht rötliche Bereiche waren auszumachen, bei denen es sich um Artefakte handelte (Abbildung 3.15).

Nach 4 Wochen war in einem Schliffpräparat der 1,5 µg-Konzentrationsgruppe keinerlei Knochengewebe auszumachen. Der Polylaktidträger lag stabil und unverändert im Muskelgewebe (Abbildung 3.16).

Nach 4 Wochen sah man in einem Präparat der 6 µg-Konzentrationsgruppe deutlich das im Muskelgewebe liegende Polylaktidimplantat. Auch hier hatte sich kein Knochengewebe neu gebildet (Abbildung 3.17).

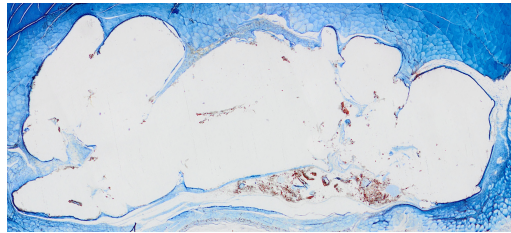


Abbildung 3.15: Polylaktidträger mit 0,24 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen



Abbildung 3.16: Polylaktidträger mit 1,5 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen

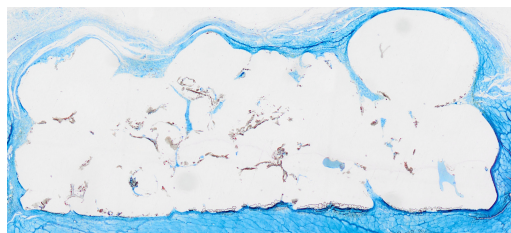


Abbildung 3.17: Polylaktidträger mit 6 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

In einem Schliffpräparat der Konzentrationsgruppe 0,24 µg nach 13 Wochen war kein neu gebildetes Knochengewebe auszumachen. Der Polylaktidträger lag stabil im Muskelgewebe und innerhalb des Implantates waren rötliche Artefakte zu erkennen (Abbildung 3.18).

Auch in einem Präparat der Konzentrationsgruppe 1,5 µg mit inkorporiertem VEGF war kein neu gebildetes Knochengewebe zu erkennen (Abbildung 3.19).

Nach 13 Wochen hatte sich auch in einem Schliffpräparat der 6 µg-Gruppe kein Knochen neu gebildet. An mehreren Stellen war es zu einer Penetration von Weichgewebe in das Polylaktidmaterial gekommen (Abbildung 3.20).

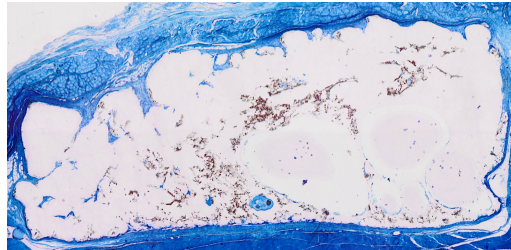


Abbildung 3.18: Polylaktidträger mit 0,24 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen

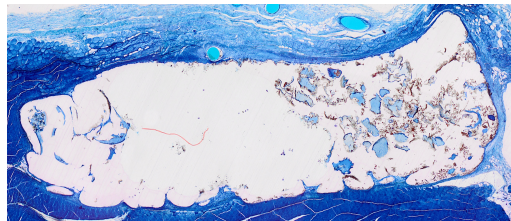


Abbildung 3.19: Polylaktidträger mit 1,5 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen

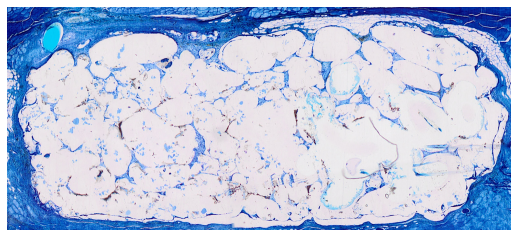


Abbildung 3.20: Polylaktidträger mit 6 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen

3.2.2 VEGF aufgetropft

Histologische Ergebnisse Nach 4 Wochen erkannte man in einem Schliffpräparat der 0,24 µg-Konzentrationsgruppe mit aufgetropftem VEGF den im Muskelgewebe eingebetteten Polylaktidträger. An vereinzelt Stellen zeigte sich Weichgewebe innerhalb des Trägers. Knochengewebe war nicht zu sehen (Abbildung 3.21).

In einem Präparat der 1,5 µg-Konzentrationsgruppe war der unverändert im Weichgewebe liegende Polylaktidträger auszumachen. Knochengewebe hatte sich nicht neu gebildet (Abbildung 3.22). Auch in einem Präparat der 6 µg-Gruppe nach 4 Wochen mit aufgetropftem VEGF war kein neu gebildetes Knochengewebe auszumachen. Innerhalb des Polylaktidimplantates waren rötliche, artifizielle Bereiche zu sehen (Abbildung 3.23).

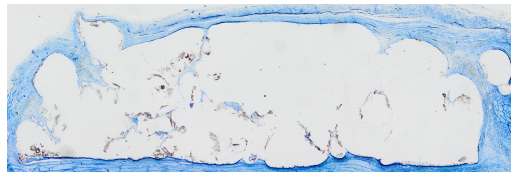


Abbildung 3.21: Polylaktidträger mit 0,24 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen

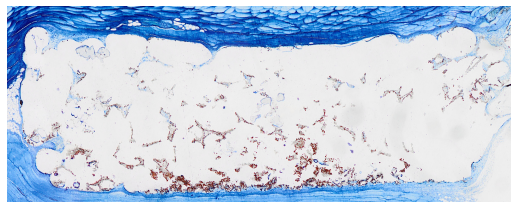


Abbildung 3.22: Polylaktidträger mit 1,5 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen

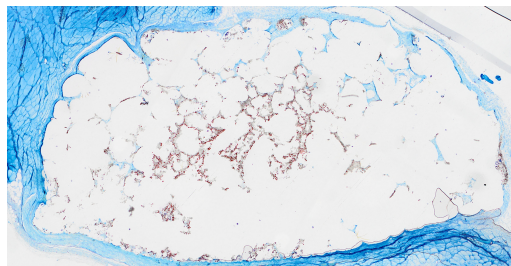


Abbildung 3.23: Polylaktidträger mit 6 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

In einem Schliffpräparat der 0,24 µg-Konzentrationsgruppe hatte sich nach 13 Wochen kein Knochen neu gebildet. Der Polylaktidträger lag nahezu unverändert im Muskelgewebe und an einigen Stellen war Weichgewebe innerhalb des Polylaktidmaterials zu erkennen (Abbildung 3.24).

Nach 13 Wochen war in der 1,5 µg-Konzentrationsgruppe kein neu gebildetes Knochengewebe zu erkennen. Der Polylaktidträger lag unverändert und leicht mit Weichgewebe durchsetzt im Muskelgewebe (Abbildung 3.25).

Auch in einem Schliffpräparat der 6 µg-Gruppe mit aufgetropftem VEGF war nach 13 Wochen kein Knochengewebe neu entstanden. An mehreren Stellen war der Polylaktidträger jedoch mit Weichgewebe durchsetzt (Abbildung 3.26).

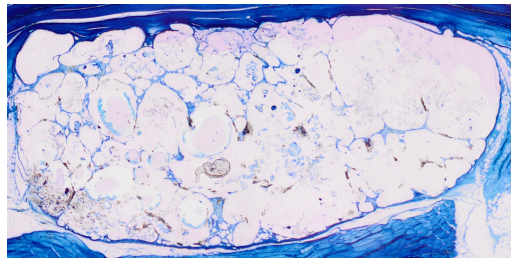


Abbildung 3.24: Polylaktidträger mit 0,24 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen

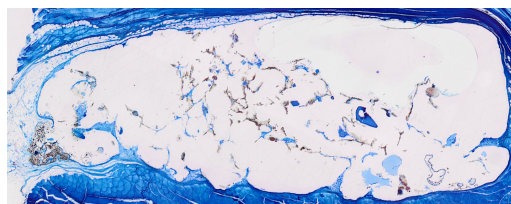


Abbildung 3.25: Polylaktidträger mit 1,5 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen

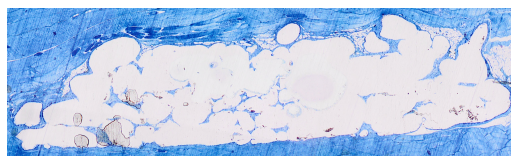


Abbildung 3.26: Polylaktidträger mit 6 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen

Die in vereinzelt Präparaten erkennbaren roten Bereiche stellten kein Knochengewebe dar, sondern waren lediglich Artefakte. Verglichen mit den rhBMP-2-Präparaten, in denen es zu deutlicher Knochenbildung kam, unterschieden sie sich in Farbton und Struktur und ließen sich so eindeutig von neu gebildetem Knochengewebe abgrenzen (vgl. Abbildung 3.6).

3.3 Kombinationspräparate (VEGF + rhBMP-2)

3.3.1 VEGF und rhBMP-2 inkorporiert

Histologische Ergebnisse Ein Schliffpräparat der Konzentrationskombination 1,5 + 24 µg nach 4 Wochen zeigte einen randständigen Knochensaum mit Tendenz zum inneren Bereich des Polylaktidträgers. Es war ein einzelner, im Träger lokalisierter Knochenbereich zu sehen. Die Geometrie des Polylaktidträgers war erhalten und erkennbar (Abbildung 3.27).

Nach 4 Wochen waren in einem Präparat der Konzentrationskombination 6 + 24 µg vereinzelte Areale neu gebildeten Knochengewebes innerhalb des Polylaktidträgers festzustellen (Abbildung 3.28).

In einem Präparat der Kombination 1,5 + 48 µg nach 4 Wochen war sowohl randständig in Form eines schmalen Saums als auch innerhalb des Trägers Knochen auszumachen. So hatte sich an mehreren Stellen im Polylaktidträger Knochengewebe entwickelt, welches z.T. trabekelartige Formen aufwies (Abbildung 3.29).

Nach 4 Wochen war in einem Schliffpräparat der Kombination 6 + 48 µg der neu gebildetet Knochen als randständiger, schmaler Knochensaum erkennbar. Innerhalb des Polylaktidimplantates war noch kein Knochengewebe festzustellen (Abbildung 3.30).

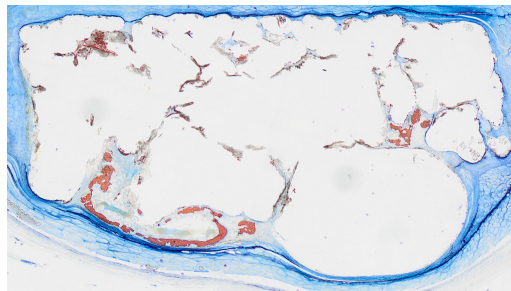


Abbildung 3.27: Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen



Abbildung 3.28: Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

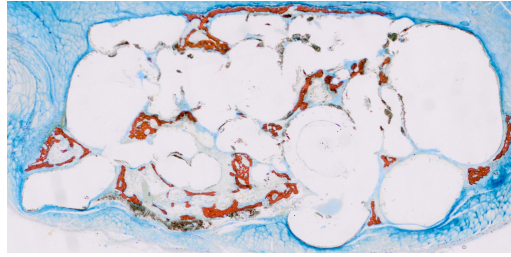


Abbildung 3.29: Poly(lactid)träger mit inkorporiertem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

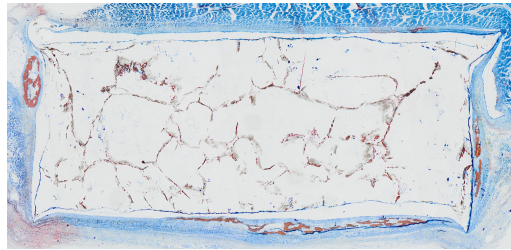


Abbildung 3.30: Poly(lactid)träger mit inkorporiertem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

Nach 13 Wochen erkannte man in einem Schliffpräparat der Konzentrationskombination 1,5 + 24 µg, dass sich im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Wochen ein deutlich ausgeprägterer, randständiger Knochensaum gebildet hatte. Auch innerhalb des Poly(lactid)implantates zeigten sich neu gebildete Knocheninseln (Abbildung 3.31).

In einem Schliffpräparat der Konzentrationskombination 6 + 24 µg war nach 13 Wochen eine deutliche Zunahme an neu gebildetem Knochengewebe erkennbar. Dieser hatte sich saumartig am Rand, aber auch innerhalb des gut sichtbaren Scaffolds gebildet (Abbildung 3.32).

In einem Präparat der Konzentrationskombination 1,5 + 48 µg war nach 13 Wochen eine beginnende Durchwachsung des Poly(lactid)trägers festzustellen: Innerhalb des Trägers hatte sich an multiplen Stellen Knochen neu gebildet. Am Rand des Poly(lactid)trägers war ein Knochensaum erkennbar (Abbildung 3.33).

Auch in einem Schliffpräparat der Kombination 6 + 48 µg war zum Zeitpunkt 13 Wochen eine deutliche Durchwachsung des Poly(lactid)trägers durch neu gebildetes Knochengewebe erkennbar (Abbildung 3.34).

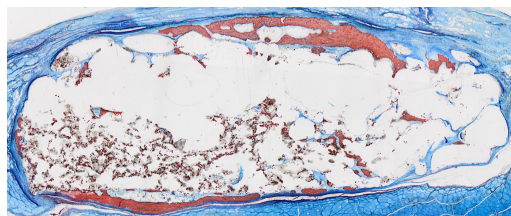


Abbildung 3.31: Poly(lactid)träger mit inkorporiertem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

3 Ergebnisse



Abbildung 3.32: Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

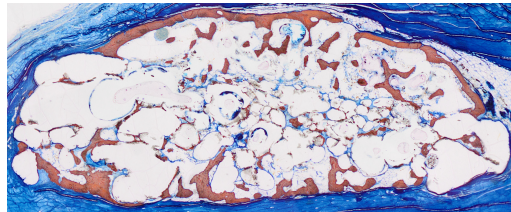


Abbildung 3.33: Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

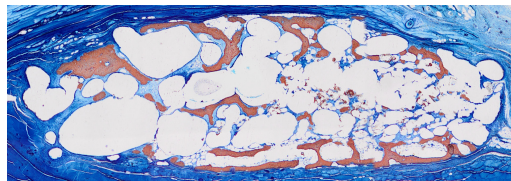


Abbildung 3.34: Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

3 Ergebnisse

Histomorphometrie Nach 4 Wochen zeigte sich bei den Kombinationspräparaten mit inkorporiertem VEGF und rhBMP-2 der Konzentrationsgruppe 1,5 + 24 µg eine Knochenneubildung von 1,34%. Bei der Kombination 6 + 24 µg betrug der Wert 3,54%. Die Kombination 1,5 + 48 µg zeigte nach der Zeitspanne von 4 Wochen mit 4,9% den höchsten Anteil neu gebildeten Knochens. Die Gruppe mit 6 + 48 µg lag bei 2,14%. Der Unterschied zwischen den Konzentrationsgruppen 1,5 + 24 µg und 1,5 + 48 µg war signifikant ($p = 0,0329$). Nach 13 Wochen war die größte Knochenneubildung bei den Kombinationen 1,5 + 48 µg und 6 + 48 µg mit 11,56% bzw. 11,76% festzustellen, was bei beiden Gruppen eine deutliche Zunahme bedeutete. Eine Steigerung der Knochenneubildung war mit 5,9% bzw. 4,62% nach 13 Wochen auch bei den Kombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg zu verzeichnen. Signifikante Unterschiede lagen jeweils zwischen den Kombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 48 µg ($p = 0,0051$) bzw. 6 + 24 µg und 6 + 48 µg ($p = 0,0273$) vor (Abbildung 3.35).

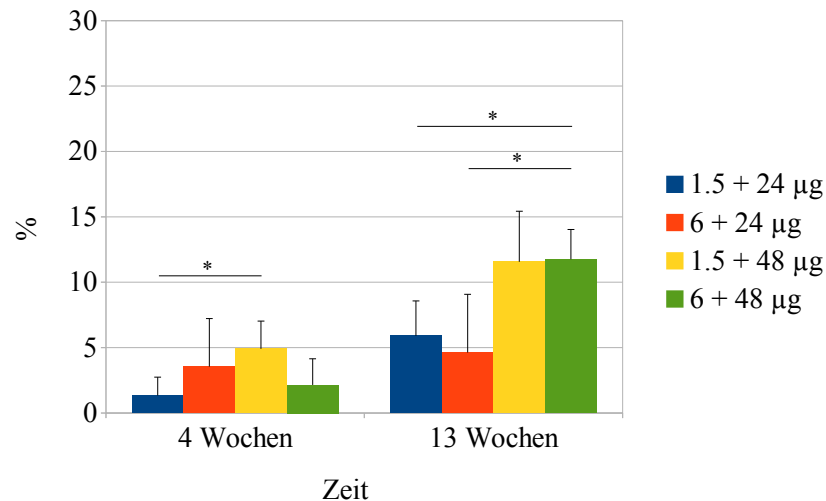


Abbildung 3.35: Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit inkorporiertem VEGF und rhBMP-2

3.3.2 VEGF und rhBMP-2 aufgetropft

Histologische Ergebnisse In einem Schliffpräparat der 1,5 + 24 µg-Konzentrationskombination mit aufgetropftem VEGF und rhBMP-2 waren nach 4 Wochen am Rand des Polylaktidimplantates Bereiche neu gebildeten Knochengewebes auszumachen, die keinen Kontakt zum Polylaktidmaterial aufwiesen. An einem der kurzen Ende des Scaffolds zeigte das Knochengewebe Tendenzen, in das benachbarte Muskelgewebe zu wachsen (Abbildung 3.36).

Nach 4 Wochen war auch in einem Präparat der 6 + 24 µg-Konzentrationskombination die randständige Lokalisation des neu gebildeten Knochengewebes zu erkennen. Innerhalb des Scaffolds sah man rötliche, artifizielle Bereiche (Abbildung 3.37).

Ein Schliffpräparat der 1,5 + 48 µg-Konzentrationskombination nach 4 Wochen zeigte vereinzelte Areale neu gebildeten Knochens, die sich besonders im Bereich der kurzen Enden des Polylaktidträgers teilweise kappenartig ausgebildet hatten (Abbildung 3.38).

In der 6 + 48 µg-Konzentrationsgruppe mit aufgetropftem VEGF und rhBMP-2 hatte sich nach 4 Wochen sehr wenig Knochen neu gebildet. Man sah am Rand des deutlich erkennbaren Polylaktidträgers zwei Bereiche mit Knochengewebe, die keinen Kontakt zur Implantatoberfläche aufwiesen (Abbildung 3.39).



Abbildung 3.36: Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

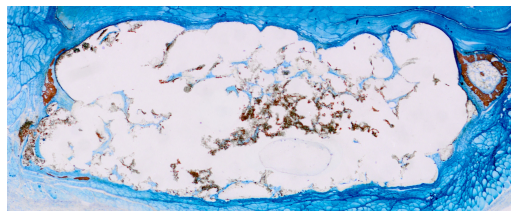


Abbildung 3.37: Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

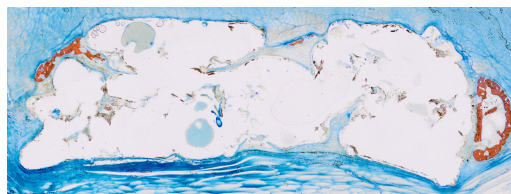


Abbildung 3.38: Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

3 Ergebnisse

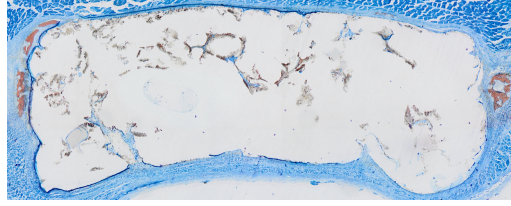


Abbildung 3.39: Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen

Nach 13 Wochen waren in einem Präparat der Konzentrationskombination 1,5 + 24 µg homogene Areale neu gebildeten Knochens erkennbar, die überwiegend im Muskelgewebe lokalisiert waren und keinen Kontakt zum Polylaktidträger aufwiesen. Im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Wochen hatte der Anteil an neu gebildetem Knochengewebe zugenommen (Abbildung 3.40).

In einem Schliffpräparat der Kombination 6 + 24 µg hatte sich nach 13 Wochen nur wenig Knochen neu gebildet. Es waren einzelne Knochenareale zu erkennen. Diese lagen mehr im Muskelgewebe und hatten keinen Kontakt zum Polylaktidimplantat (Abbildung 3.41).

Nach 13 Wochen zeigte sich in einem Präparat der Konzentrationskombination 1,5 + 48 µg eine Zunahme der Knochenneubildung im Vergleich zum früheren Zeitpunkt. Das neu gebildete Knochengewebe umgab den Polylaktidträger manschettenartig und schien sich besonders an einem der kurzen Enden des Trägers in das umgebende Weichgewebe auszudehnen. Im Inneren des Implantates war kein Knochengewebe erkennbar (Abbildung 3.42).

In einem Schliffpräparat der Konzentrationsgruppe 6 + 48 µg nach 13 Wochen erkannte man eine deutliche Zunahme des Anteils neu gebildeten Knochens im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Wochen. Das Knochengewebe hatte sich sowohl randständig als auch im Inneren des Polylaktidträgers gebildet. An den kurzen Enden des Trägers schien sich der neu gebildete Knochen kappenartig ins Muskelgewebe auszudehnen (Abbildung 3.43).

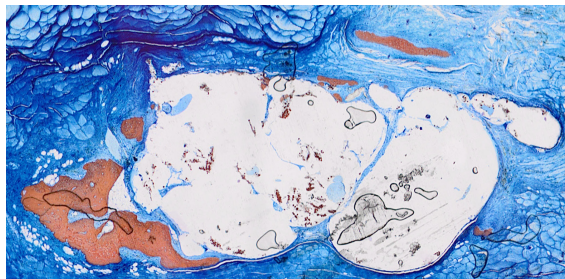


Abbildung 3.40: Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

3 Ergebnisse

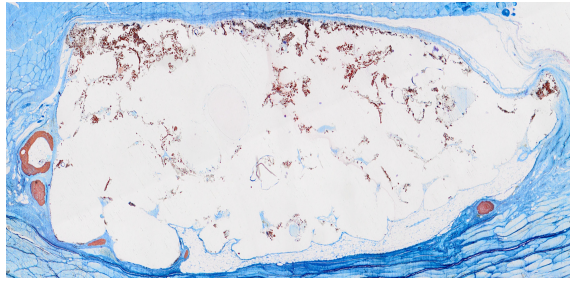


Abbildung 3.41: Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

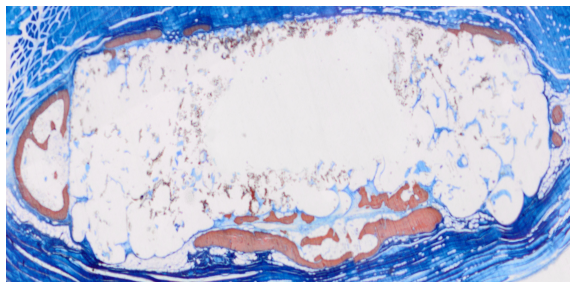


Abbildung 3.42: Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

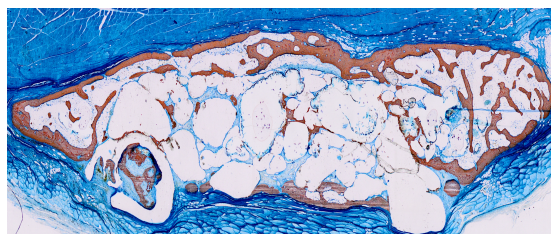


Abbildung 3.43: Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen

3 Ergebnisse

Histomorphometrie Nach 4 Wochen zeigte sich in der 1,5 + 24 µg-Konzentrationsgruppe mit aufgetropftem VEGF und rhBMP-2 eine Knochenneubildung von 3,43%. Nach 13 Wochen kam es zu einer Zunahme auf 5,98%. In der Kombination 6 + 24 µg war die Knochenneubildung am geringsten mit 1,44% nach 4 Wochen und 1,56% nach 13 Wochen. In der Konzentrationsgruppe 1,5 + 48 µg war eine Zunahme der Knochenneubildung von 2,26% nach 4 Wochen auf 8,16% nach 13 Wochen festzustellen. Bei der Konzentrationsgruppe 6 + 48 µg zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Knochenneubildung über die Zeit, 3,25% nach 4 Wochen bis 12,94% nach 13 Wochen. Nach 13 Wochen zeigte die 6 + 48 µg-Konzentrationsgruppe die höchste Knochenneubildung. Hier war der Unterschied zur Gruppe 6 + 24 µg signifikant ($p = 0,0017$). Außerdem unterschieden sich 6 + 24 µg und 1,5 + 48 µg signifikant voneinander ($p = 0,0250$). Zum Zeitpunkt 4 Wochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Knochenneubildung zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 3.44).

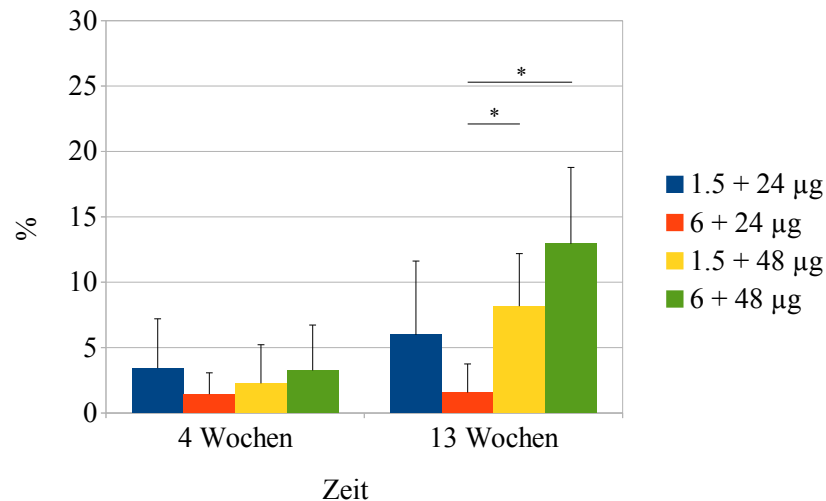


Abbildung 3.44: Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit aufgetropftem VEGF und rhBMP-2

3.4 Kontrollgruppen

Bei den Kontrollgruppen blieb die Muskeltasche entweder leer (*sham*-Operation) oder es wurde ein unbelasteter Polylaktidträger eingebracht (Kapitel 2.5.3).

Weder bei den Leerdefekten noch bei den unbelasteten Polylaktidträgern kam es zu irgendeinem Zeitpunkt zu Knochenneubildung. Im Präparat der Leerdefekte war lediglich Muskelgewebe zu sehen (Abbildung 3.45). Die Schnittpräparate der unbelasteten Polylaktidträger ließen das in den Muskel implantierte Polylaktidmaterial erkennen. Man konnte zwar in manchen Präparaten rote Bereiche ausmachen, jedoch stellten diese kein Knochengewebe dar, sondern waren lediglich Artefakte. Verglichen mit den rhBMP-2-Präparaten, in denen es zu deutlicher Knochenbildung kam, unterschieden sie sich in Farbton und Struktur und ließen sich so eindeutig von neu gebildetem Knochengewebe abgrenzen (Abbildung 3.46 und vgl. Abbildung 3.6).

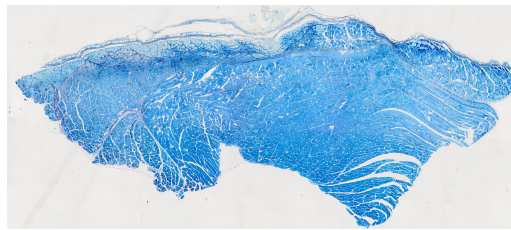


Abbildung 3.45: Leerdefekt im Muskel nach 13 Wochen

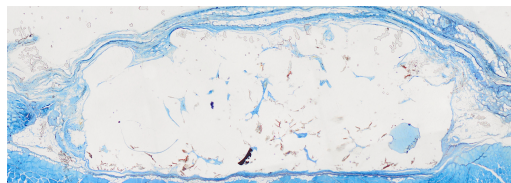


Abbildung 3.46: Unbelasteter Polylaktidträger nach 13 Wochen

3.5 Vergleich der Applikationsarten

Der globale statistische Test verdeutlichte, dass die Einflussgrößen „Zeit“, „Applikationsart“ und „Konzentration“ einen signifikanten Effekt auf die Knochenneubildung besaßen. Die Wechselwirkung zwischen „Zeit“ und „Applikationsart“ war nicht signifikant, sodass beim Vergleich der beiden Applikationsarten „inkorporiert“ und „aufgetropft“ der Unterschied in der Knochenneubildung zwischen den Applikationsarten für jede Konzentrationsstufe bzw. Konzentrationskombination jeweils für beide Zeitpunkte zusammen statistisch getestet wurde. Zur genaueren Einsicht der statistischen Auswertung sei auf den Anhang verwiesen (Kapitel 7.1).

3.5.1 rhBMP-2

In der 24 µg-Konzentrationsgruppe waren die Unterschiede in der Knochenneubildung zwischen den beiden Applikationsarten „aufgetropft“ und „inkorporiert“ signifikant ($p = 0,0103$). Nach 13 Wochen war signifikant mehr Knochen in den Präparaten mit inkorporiertem BMP entstanden (Abbildung 3.47).

Bei der Konzentration von 48 µg rhBMP-2 war zu beiden Zeitpunkten mehr Knochen bei den Polylaktidträgern mit inkorporiertem rhBMP-2 entstanden (Abbildung 3.47). Diese Unterschiede waren nicht signifikant, jedoch lag der p-Wert dicht am Signifikanzniveau ($p = 0,0579$).

In der 96 µg-Gruppe war zu den Zeitpunkten 4 und 13 Wochen mehr Knochenneubildung bei der Applikationsart „aufgetropft“ zu verzeichnen (Abbildung 3.47). Die Unterschiede in der Knochenneubildung zwischen den beiden Applikationsarten waren in der 96 µg-Gruppe nicht signifikant ($p = 0,2204$), wobei die Standardabweichung zum Zeitpunkt 13 Wochen bei den Präparaten mit aufgetropftem rhBMP-2 deutlich höher war als bei denen mit inkorporiertem rhBMP-2.

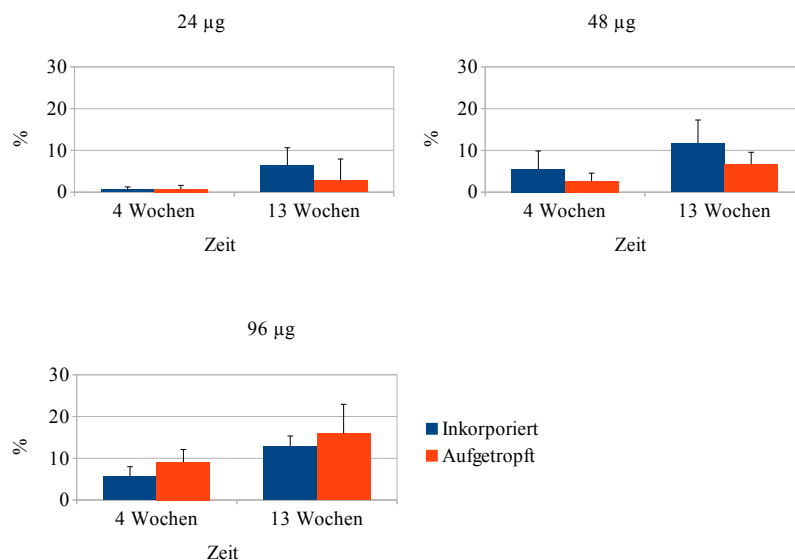


Abbildung 3.47: Vergleich der Applikationsarten für rhBMP-2

3.5.2 Kombinationspräparat

Vergleicht man nun die beiden unterschiedlichen Applikationsarten in den Kombinationspräparaten, war bei der Konzentrationsgruppe 1,5 + 24 µg nach 4 Wochen weniger Knochen bei der Applikationsart „inkorporiert“ entstanden. Nach 13 Wochen war die Menge an neu gebildetem Knochen zwischen den beiden Applikationsarten in etwa gleich. Die Standardabweichungen waren zu beiden Zeitpunkten höher bei der Applikationsart „aufgetropft“ (Abbildung 3.48). Die Menge an neu gebildetem Knochen unterschied sich zwischen „aufgetropft“ und „inkorporiert“ in der Konzentrationsgruppe 1,5 + 24 µg nicht signifikant voneinander ($p = 0,1538$).

In der Konzentrationskombination 6 + 24 µg war zu beiden Zeitpunkten mehr Knochenneubildung bei der Applikationsart „inkorporiert“ zu verzeichnen (Abbildung 3.48). Diese Unterschiede waren signifikant ($p = 0,0089$).

In der Gruppe 1,5 + 48 µg war zu beiden Zeitpunkten mehr Knochen bei den Polylaktidträgern mit inkorporierten Wachstumsfaktoren entstanden (Abbildung 3.48). Die Unterschiede waren ebenfalls signifikant ($p = 0,0072$).

Bei der Konzentrationsgruppe 6 + 48 µg lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Applikationsarten „aufgetropft“ und „inkorporiert“ vor ($p = 0,1804$). Es war jedoch zu beiden Zeitpunkten mehr Knochen bei den Polylaktidträgern mit aufgetropfter Wachstumsfaktorlösung entstanden. Die Standardabweichungen waren bei der Applikationsart „aufgetropft“ deutlich höher als bei der Applikationsart „inkorporiert“ (Abbildung 3.48).

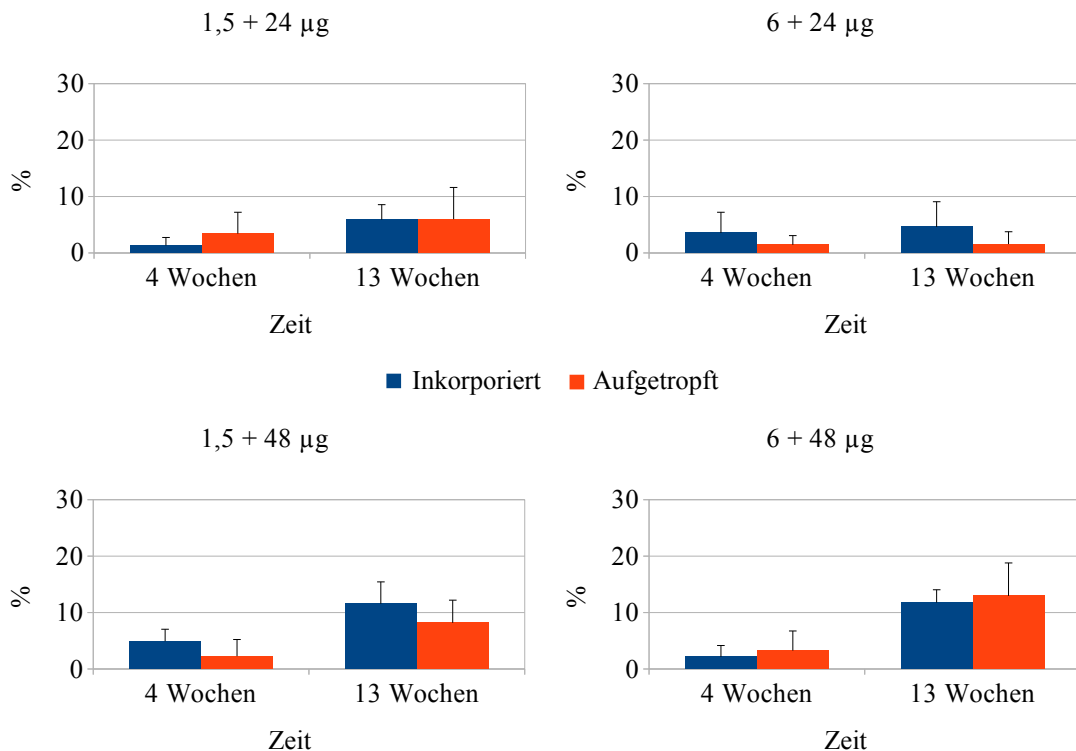


Abbildung 3.48: Vergleich der Applikationsarten für die Kombinationspräparate

3.6 Vergleich von rhBMP-2 mit Kombinationspräparaten

Der globale statistische Test zeigte, dass die Einflussgrößen „Zeit“, „Applikationsart“ und „Konzentration“ einen signifikanten Effekt auf die Knochenneubildung hatten (s.o.). Auch die Wechselwirkung zwischen „Zeit“ und „Konzentration“ war signifikant. Daher wurden zum Vergleich der Knochenneubildung in Polylaktidträgern mit rhBMP-2 mit der Knochenneubildung in Polylaktidträgern mit VEGF und rhBMP-2 für die jeweilige Applikationsart für jeden Zeitpunkt Paarvergleiche durchgeführt. Zu genaueren Einsicht der statistischen Auswertung sei auf den Anhang verwiesen (Kapitel 7.1). Verglichen wurden 96 µg rhBMP-2 mit den 48 µg-Kombinationspräparaten, 48 µg rhBMP-2 mit den 48 µg-Kombinationspräparaten, 48 µg rhBMP-2 mit den 24 µg-Kombinationspräparaten und 24 µg rhBMP-2 mit den 24 µg-Kombinationspräparaten, um zu untersuchen, ob die Kombinationspräparate den rhBMP-2 Präparaten überlegen sind.

3.6.1 96 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)

Applikationsart „inkorporiert“ Beim Vergleich der Präparate mit inkorporiertem 96 µg rhBMP-2 mit den inkorporierten 48 µg-Kombinationspräparaten war nach 4 Wochen am meisten Knochen bei den Polylaktidträgern mit 96 µg rhBMP-2 entstanden (Abbildung 3.49). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

Auch nach 13 Wochen war bei 96 µg rhBMP-2 die höchste Knochenneubildung zu verzeichnen, was jedoch nicht signifikant war (Abbildung 3.49).

Applikationsart „aufgetropft“ Bei den Präparaten mit aufgetropften Wachstumsfaktoren war zu beiden Zeitpunkten die höchste Knochenneubildung bei 96 µg rhBMP-2 zu verzeichnen (Abbildung 3.49). Nach 4 Wochen unterschieden sich die Präparate mit aufgetropftem 96 µg rhBMP-2 und die 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparate signifikant voneinander ($p = 0,0072$). Nach 13 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

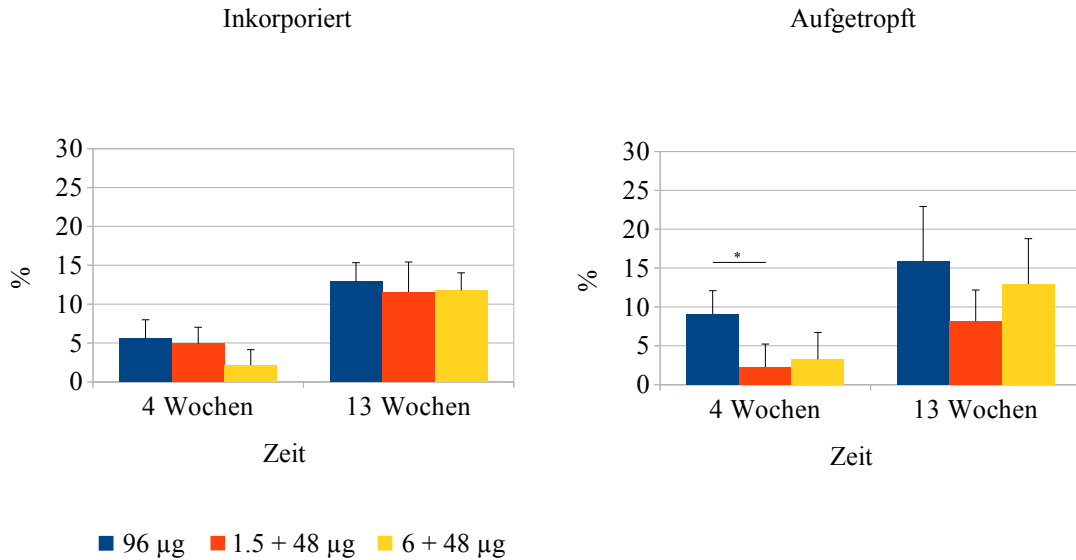


Abbildung 3.49: 96 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)

3.6.2 48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)

Applikationsart „inkorporiert“ Vergleicht man die Präparate mit 48 µg inkorporiertem rhBMP-2 mit den entsprechenden Kombinationspräparaten, hatte sich nach 4 Wochen am meisten Knochen in den Polylaktidträgern mit lediglich 48 µg inkorporiertem rhBMP-2 neu gebildet (Abbildung 3.50). Die Unterschiede zu den Konzentrationskombinationen 1,5 + 48 µg und 6 + 48 µg waren jedoch nicht signifikant ($p = 1,0000$ und $p = 1,0000$).

Nach 13 Wochen hatte sich in allen 3 Gruppen nahezu gleichviel Knochen neu gebildet (Abbildung 3.50). Weder 48 µg und 1,5 + 48 µg ($p = 1,0000$), noch 48 µg und 6 + 48 µg ($p = 1,0000$) unterschieden sich signifikant voneinander.

Applikationsart „aufgetropft“ Bei der Applikationsart „aufgetropft“ lagen in den 3 Gruppen nach 4 Wochen keine signifikanten Unterschiede vor. Die quantitativ höchste Knochenneubildung zeigte die Konzentrationskombination 6 + 48 µg (Abbildung 3.50).

Auch nach 13 Wochen hatte sich in den Polylaktidträgern mit aufgetropftem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat am meisten Knochen neu gebildet (Abbildung 3.50). Der Unterschied zur 48 µg-Konzentrationsgruppe war nach 13 Wochen nicht signifikant ($p = 0,5121$).

3 Ergebnisse

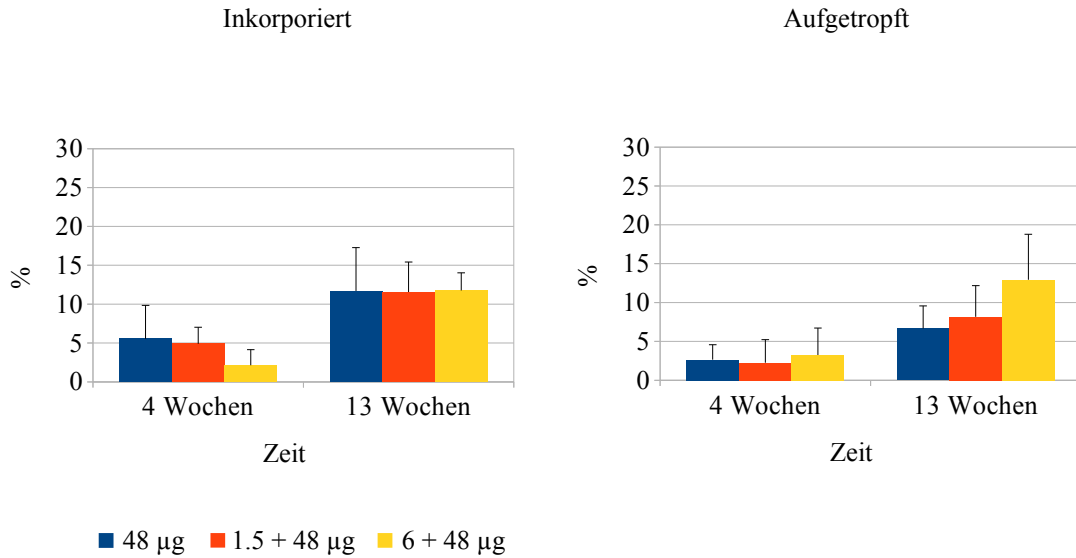


Abbildung 3.50: 48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)

3.6.3 48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)

Applikationsart „inkorporiert“ Zu beiden Zeitpunkten hatte sich bei den Polylaktidträgern mit 48 µg rhBMP-2 verglichen mit den Kombinationspräparaten mit inkorporiertem VEGF + 24 µg die größte Menge Knochen neu gebildet. Dies war nicht signifikant (Abbildung 3.51).

Applikationsart „aufgetropft“ Vergleicht man die Gruppe mit 48 µg aufgetropftem rhBMP-2 mit den Kombinationspräparaten mit aufgetropftem VEGF + 24 µg rhBMP-2 zeigte die Konzentrationskombination 1,5 + 24 µg zum Zeitpunkt 4 Wochen die höchste Knochenneubildung (Abbildung 3.51). Die Unterschiede zwischen den 3 Gruppen waren nicht signifikant. Nach 13 Wochen hatte sich in den reinen 48 µg-rhBMP-2 Präparaten die größte Menge Knochen neu gebildet (Abbildung 3.51). Der Unterschied zwischen 48 µg und 6 + 24 µg war zum Zeitpunkt 13 Wochen signifikant ($p = 0,0309$).

3 Ergebnisse

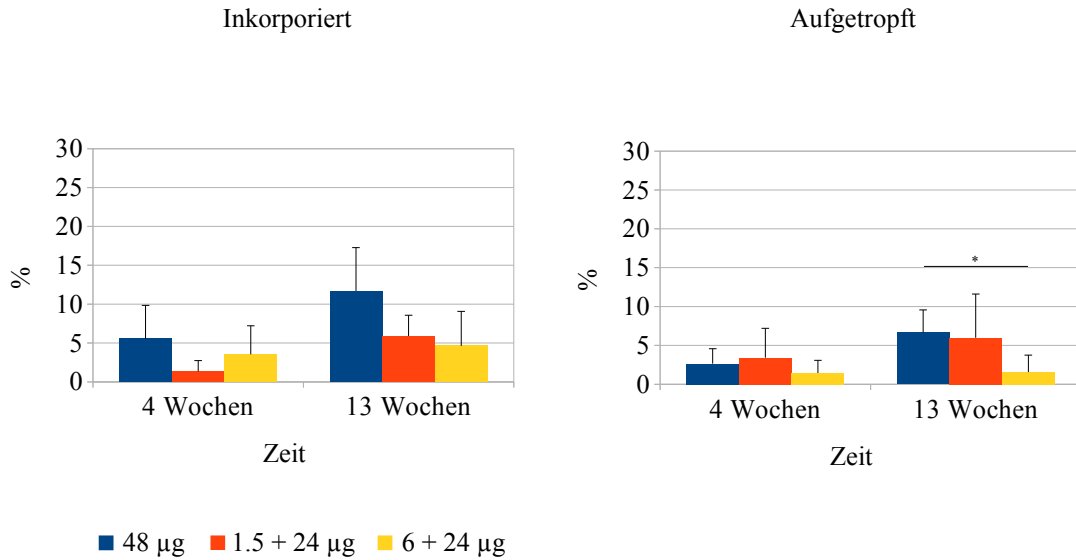


Abbildung 3.51: 48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)

3.6.4 24 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)

Applikationsart „inkorporiert“ Im Vergleich der Gruppen mit inkorporiertem 24 µg rhBMP-2 und entsprechendem inkorporiertem Kombinationspräparat hatte sich nach 4 Wochen am meisten Knochen bei der Konzentrationskombination 6 + 24 µg neu gebildet (Abbildung 3.52). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Nach 13 Wochen zeigte die Konzentrationsgruppe 24 µg die höchste Knochenneubildung (Abbildung 3.52). Auch zum Zeitpunkt 13 Wochen unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander.

Applikationsart „aufgetropft“ Zu beiden Zeitpunkten kam es bei der Konzentrationskombination 1,5 + 24 µg zur höchsten Knochenneubildung (Abbildung 3.52). Zu keinem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationsgruppen festzustellen.

3 Ergebnisse

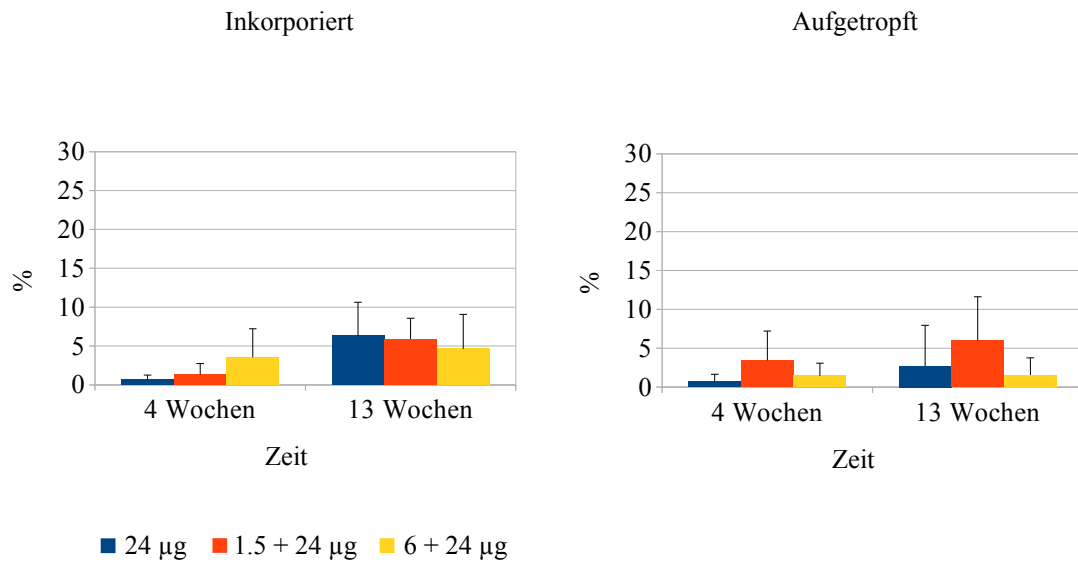


Abbildung 3.52: 24 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)

4 Diskussion

4.1 Applikation von Wachstumsfaktoren zur Knochenneubildung

Der gezielte Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Knochenregeneration und -heilung stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, Knochendefekte in Zukunft ohne die Verwendung von autogenen Transplantaten zu therapieren.

Bereits 1965 entdeckte Marshall R. Urist die starke osteogene Potenz des BMP (Urist 1965). Auch die Entschlüsselung der genetischen Sequenz verschiedener Isoformen des BMP bedeutete einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer möglichen therapeutischen Applikation von BMP, da es nun möglich war, BMP synthetisch herzustellen (Wozney et al. 1988). Seither wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, in denen die osteogene Wirkung verschiedener BMPs in unterschiedlichen Applikationsdosen sowohl *in vitro* (Boden et al. 1996, Hughes et al. 1995, Yamaguchi et al. 1996) als auch *in vivo* (Arosarena und Collins 2005 b, Uludag et al. 2000) untersucht wurde. Uludag et al. analysierten im ektopen Tiermodell rhBMP-2 und rhBMP-4 und stellten fest, dass von der Isoform rhBMP-4 höhere Dosen als vom rhBMP-2 notwendig sind, um eine nahezu gleiche Knochenneubildung zu erreichen. Die Isoform rhBMP-2 zeigte demnach eine größere osteoinduktive Wirkung (Uludag et al. 2000). Dies wurde auch in einer jüngeren Studie von Arosarena und Collins deutlich, in der es mehrheitlich bei Applikation von BMP-2 verglichen mit BMP-4 zu einer Defektüberbrückung eines *critical size defects* im Unterkiefer der Ratte kam (Arosarena und Collins 2005 b). Im ektopen Tiermodell untersuchten Gruber et al. die Wirkung von rhBMP-2 und konnten erfolgreich eine Knochenneubildung hervorrufen, wobei dies lediglich für eine hohe Konzentrationsdosis von 96 µg galt (Gruber et al. 2009).

Die herausragende Bedeutung des rhBMP-2 ist offensichtlich, jedoch ergibt sich das Problem, dass die in den Studien verwandten Konzentrationen von BMP weit über den unter physiologischen Bedingungen im Organismus auftretenden Konzentrationen liegen und so nur bedingt den physiologischen Heilungsprozess simulieren. Osteoinduktive Proteine wie die BMPs werden in der Entzündungsphase während des Knochenheilungsprozesses ausgeschüttet (Desai et al. 2003). Ihr Anteil liegt im Rahmen physiologischer Heilungsprozesse bei Bruchteilen von Mikrogramm pro Milligramm Knochengewicht (Arosarena und Collins 2005 b). Um physiologische Konzentrationen an applizierten Wachstumsfaktoren zu erreichen, müssen neue Wege gefunden werden, die BMP-Konzentration zu verringern, ohne gleichzeitig weniger Knochenneubildung zu erhalten.

In der vorliegenden Studie erfolgte dies durch die kombinierte Gabe von rhBMP-2 und VEGF. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch die kombinierte Applikation der beiden Wachstumsfaktoren eine ektope Knochenneubildung hervorzurufen.

Bei der Verwendung der Kombinationspräparate mit inkorporiertem rhBMP-2 und VEGF zeigte

sich in den meisten Fällen wie bei den Gruppen, in denen ausschließlich inkorporiertes rhBMP-2 implantiert wurde, eine über die Zeit kontinuierlich zunehmende Knochenneubildung. Dabei scheint die Dosis des eingesetzten rhBMP-2 eine Rolle zu spielen. Eine höhere rhBMP-2-Dosis führt zu einer erhöhten Knochenneubildung. Dies zeigte sich deutlich zum Zeitpunkt 13 Wochen, bei dem es sowohl bei der Konzentrationskombination 1,5 + 48 µg als auch bei 6 + 48 µg zur höchsten Knochenneubildung kam. Zum Zeitpunkt 4 Wochen war am meisten Knochen bei der Kombination 1,5 + 48 µg entstanden. Aber auch die Menge an VEGF im Kombinationspräparat scheint die Knochenneubildung zu beeinflussen. Es ist festzustellen, dass nach 4 Wochen bei den Kombinationen 1,5 + 48 µg und 6 + 48 µg mehr Knochenneubildung bei der erstgenannten Kombination zu verzeichnen war, wobei dieser größere Zuwachs der Kombination 1,5 + 48 µg nicht signifikant war. Diese Tendenz zeigte sich auch nach 13 Wochen bei den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg, wobei der Unterschied nicht signifikant war.

Bei den Gruppen mit aufgetropftem Kombinationspräparat waren die oben beschriebenen Beobachtungen nicht so deutlich ausgeprägt. So zeigte sich lediglich bei den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg zu beiden Zeitpunkten eine höhere Knochenneubildung bei den Präparaten mit geringerem VEGF-Zusatz. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Bei den Kombinationen 1,5 + 48 µg und 6 + 48 µg kam es zu beiden Zeitpunkten zu einer höheren Knochenneubildung bei den Präparaten mit 6 µg VEGF-Zusatz. Jedoch waren die Standardabweichungen sehr hoch, was die starke Streuung der Mittelwerte und die unkontrolliertere Knochenneubildung im Vergleich zur Applikationsart „inkorporiert“ verdeutlicht.

Der Vergleich der Kombinationspräparate mit der isolierten Gabe von rhBMP-2 zeigte, dass die Polylaktidimplantate mit inkorporiertem 96 µg rhBMP-2 zu beiden Zeitpunkten keine signifikant höhere Knochenneubildung als die Kombinationspräparate mit inkorporiertem 48 µg rhBMP-2 mit 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF-Zusatz induzierten. Dies war auch bei den Gruppen mit aufgetropften Wachstumsfaktoren der Fall, wo nur der Unterschied in der Knochenneubildung zwischen 96 µg und 1,5 + 48 µg nach 4 Wochen signifikant war. Hier sei jedoch abermals auf die hohen Standardabweichungen hingewiesen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es möglich ist, mit 48 µg rhBMP-2 in Verbindung mit VEGF eine ähnlich hohe Knochenneubildung wie mit der isolierten Gabe einer doppelt so hohen Dosis an rhBMP-2 (96 µg) zu induzieren. Die Ergebnisse der Polylaktidträger mit ausschließlich inkorporiertem rhBMP-2 zeigen jedoch, dass auch die isolierte Applikation von 48 µg rhBMP-2 zu keiner signifikant geringeren ektopen Knochenneubildung im Vergleich zum 96 µg-Präparat führte. Es konnte demnach nicht nachgewiesen werden, dass der Zusatz von VEGF in den verwandten Konzentrationen im Polylaktidträger die ektopen Knochenneubildung quantitativ entscheidend positiv beeinflusst. Diese Beobachtung wird weiter unterstrichen durch die Ergebnisse des Vergleichs des 48 µg-Präparats mit den Konzentrationskombinationen 1,5 + 48 µg und 6 + 48 µg. Man würde vermuten, dass es bei positivem Effekt des VEGF-Zusatzes zu einer signifikant höheren Knochenneubildung in den 48 µg-Kombinationspräparaten käme. Stattdessen zeigten die Kombinationspräparate mit inkorporiertem 48 µg rhBMP-2 und VEGF-Zusatz eine quantitativ ähnliche Knochenneubildung wie die Polylaktidträger mit inkorporierten 48 µg rhBMP-2. Auch bei den Polylaktidträgern mit aufgetropfter Wachstumsfaktorlösung war dies zu beobachten, da auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Kombinationspräparat und dem Präpa-

rat mit ausschließlich 48 µg rhBMP-2 vorlagen.

Der Vergleich der Polylaktidträger mit 48 µg rhBMP-2 und den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg zeigte ebenfalls keinen signifikanten quantitativen Effekt des Zusatzes von VEGF auf die ektope Knochenneubildung. Hier würde man vermuten, dass bei einer Unterstützung der Knochenneubildung durch VEGF-Zusatz eine quantitativ ähnliche Knochenneubildung durch das 24 µg Kombinationspräparat im Vergleich zur isolierten Applikation von 48 µg induziert werden würde. Jedoch kam es bei den inkorporierten Wachstumsfaktoren zu beiden Zeitpunkten zu mehr Knochenneubildung beim 48 µg-Präparat im Vergleich zu den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg. Dies galt auch für den Zeitpunkt 13 Wochen bei der Applikationsart „aufgetropft“. Dort zeigte die Gruppe mit 48 µg signifikant mehr Knochenneubildung verglichen mit der Kombination 6 + 24 µg. Schließlich wies der Vergleich der Polylaktidimplantate mit 24 µg rhBMP-2 mit den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 24 µg keine signifikanten Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass die Beimengung von VEGF in den verwandten Konzentrationen in diesem Tiermodell keinen entscheidend positiven Einfluss auf die Menge an ektop neu gebildetem Knochen besaß.

Qualitativ waren keine Unterschiede zwischen der isolierten Gabe von rhBMP-2 und dem Kombinationspräparat zu beobachten. So kam es sowohl bei den Gruppen mit inkorporiertem rhBMP-2 als auch bei den Gruppen mit inkorporiertem Kombinationspräparat zu den frühen Zeitpunkten zunächst zu einer randständigen, vereinzelt Knochenneubildung, welche im Verlauf weiter zunahm und nach 13 Wochen die Polylaktidträger zum Teil vollständig durchsetzte.

Bei den Gruppen mit ausschließlich aufgetropftem oder inkorporiertem Wachstumsfaktor VEGF war ähnlich wie bei den Kontrollgruppen weder nach 4 Wochen noch nach 13 Wochen Knochenneubildung zu erkennen. Auch nach 13 Wochen lag der Polylaktidträger unverändert im Gewebe, ohne dass sich Knochengewebe gebildet hatte. In manchen Schliffpräparaten waren rötliche Bereiche zu erkennen, die man aber deutlich von neu gebildetem Knochengewebe unterscheiden konnte und die somit Artefakte darstellten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Wachstumsfaktor VEGF alleine in der ektopen Region der Ratte keine Knochenneubildung zu induzieren vermag. Zusammenfassend zeigen die histomorphometrischen und histologischen Ergebnisse, dass es möglich ist, durch Einbringung mit rhBMP-2 und VEGF beladener Polylaktidimplantate in der ektopen Region der Ratte zuverlässig Knochenneubildung zu induzieren. Die Zugabe des Wachstumsfaktors VEGF schien jedoch in diesem Tiermodell die Knochenneubildung nicht in entscheidender Weise positiv zu beeinflussen und ermöglicht keine Einsparung von rhBMP-2. Dem rekombinanten Wachstumsfaktor rhBMP-2 kommt daher weiterhin die herausragende Rolle in der ektopen Knochenneubildung zu.

4.2 Polylaktid als Trägermaterial

4.2.1 Kontrollierte Freisetzung und Knochenneubildung

In der vorliegenden Studie wurden zur Einbringung der Wachstumsfaktoren Implantate aus Polylaktid verwendet. Zahlreiche vorhergehende Studien konnten bereits zeigen, dass sich Polymere prinzipiell als Träger für Wachstumsfaktoren eignen (Boyan et al. 1999, Zegzula et al. 1997). Da

eine kontrollierte Freisetzung der osteoinduktiven Faktoren über einen längeren Zeitraum die Situation *in vivo* am besten simuliert, wird nach Möglichkeiten geforscht, die Wachstumsfaktoren in die Polymer-Matrix einzubetten, damit bei Hydrolyse diese Faktoren nach und nach an das umliegende Gewebe abgegeben werden können.

Die Inkorporation von Wachstumsfaktoren kann über eine Verflüssigung des Polymer-Materials und die Beimengung des Wachstumsfaktors erreicht werden. Hier ergibt sich jedoch ein Spannungsfeld zwischen der Temperatur, bei der sich das Polymer verflüssigt, einerseits und der Temperatur, bei der Proteine denaturieren, andererseits, da diese niedriger ist als die benötigte Temperatur für die Verflüssigung des Polylaktids. Eine Lösung dieses Problems liegt in der Technik des *solvent casting/particulate leaching*, die als erstes von Mikos et al. beschrieben wurde (Mikos et al. 1994) und die auch bei Polylaktiden angewendet werden kann. Dabei wird eine Verflüssigung des Polymers durch Zugabe von Lösungsmitteln wie Chloroform oder Methylenchlorid erreicht. Neben der hohen Zeitaufwendigkeit dieses Verfahrens, der Entstehung ungleichmäßiger Poren und der schlechten Interkonnektivität des hergestellten Polymers, besteht der größte Nachteil darin, dass hochgiftige Lösungsmittel ihre Anwendung finden und damit die Biokompatibilität des Polymers stark eingeschränkt wird (Hutmacher 2000).

Alternativ kann das Verfahren des *gas foaming* zur Inkorporation von Wachstumsfaktoren in Polymere herangezogen werden. Dabei ist es durch Diffusion der Gasmoleküle in die Polymer-Matrix infolge einer CO₂-Hochdruckbegasung möglich, die Polymere bei Temperaturen zwischen 30-40 °C zu verarbeiten und so hitzeempfindliche Proteine wie Wachstumsfaktoren mit einzufassen (Hutmacher 2000). Yang et al. gelang es 2004 auf diese Weise, rhBMP-2 in Polylaktid zu inkorporieren und sowohl *in vitro* durch immunohistochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) als auch *in vivo* durch Induktion ektoper Knochenneubildung in Verbindung mit humanen Osteoprogenitorzellen die Wirkung des inkorporierten rhBMP-2 nachzuweisen (Yang et al. 2004). Schliephake et al. beschrieben 2007 als Erste in einer *in vitro* Studie die Freisetzungskinetik von Polylaktidimplantaten, welche auf diese Weise hergestellt wurden. Dabei wurde zum einen die Freisetzung des Wachstumsfaktors aus dem Polylaktid beobachtet und zum anderen die biologische Aktivität des inkorporierten rhBMP-2 durch Messung der AP-Induktion analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass rhBMP-2 durch CO₂-Hochdruckbegasung in das poröse Polylaktid erfolgreich integriert wird und dass biologisch aktives rhBMP-2 trotz einer kurzfristig erhöhten Freisetzung nach 24 Stunden im Anschluss über einen längeren Zeitraum gleichmäßig aus den sich zersetzenden Polylaktidimplantaten freigesetzt wird (Schliephake et al. 2007). Auch Gruber et al. beschrieben 2009 eine Freisetzung von rhBMP-2 aus durch *gas foaming* hergestellten Polylaktidimplantaten, die sich nach anfänglicher erhöhter Freisetzung zwischen 24 und 48 Stunden über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Tagen erstreckte und deren Freisetzungsrate von der Konzentration an inkorporiertem rhBMP-2 abhing (Gruber et al. 2009).

In der vorliegenden Studie wurde dieses Herstellungsverfahren gewählt und mit der Applikation von rhBMP-2 durch intraoperatives Auftropfen auf das unbeladene Polylaktidimplantat verglichen. In den Gruppen mit ausschließlicher Applikation von rhBMP-2 war der Unterschied zwischen den Applikationsarten „inkorporiert“ und „aufgetropft“ in der 24 µg-Kategorie signifikant. Hier konnte nach 13 Wochen deutlich mehr Knochenneubildung in den Implantaten mit inkorporiertem rhBMP-2 als durch intraoperatives Auftropfen induziert werden. In der 48 µg-Gruppe ent-

stand zu beiden Zeitpunkten mehr Knochen bei den Polylaktidträgern mit inkorporiertem rhBMP-2. Dieser Unterschied zur Applikationsart „aufgetropft“ lag sehr dicht am Signifikanzniveau. In der 96 µg-Gruppe war zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Applikationsarten festzustellen, doch war es auffällig, dass die Standardabweichungen besonders zum Zeitpunkt 13 Wochen bei der Applikationsart „aufgetropft“ höher waren als bei „inkorporiert“. Dies weist daraufhin, dass die Polylaktidimplantate mit durch CO₂-Hochdruckbegasung inkorporiertem rhBMP-2 kontrollierter und zuverlässiger ektoper Knochenneubildung induzieren können und einer Applikation durch Auftropfen der Wachstumsfaktorlösung somit überlegen sind, da der Wachstumsfaktor sicher an der Implantationsstelle verbleibt und sukzessive über einen längeren Zeitraum abgegeben wird.

Diese Tatsache wird durch die histologischen Ergebnisse qualitativ unterstrichen. Bei Betrachtung der Schliﬀpräparate der Polylaktidträger mit inkorporiertem rhBMP-2, zeigte sich je nach Konzentrationsstufe in unterschiedlich starker Ausprägung, dass sich Knochen zunächst randständig zwischen Implantat und Weichgewebe gebildet hatte. Diese Knochenareale verdickten sich im weiteren zeitlichen Verlauf und nach 13 Wochen waren die meisten Polylaktidträger mit Knochen durchsetzt. Im Gegensatz dazu schien sich der neu gebildete Knochen bei Polylaktidträgern mit aufgetropftem rhBMP-2 ausgehend vom Implantat mehr und mehr in das umgebende Weichgewebe auszudehnen, sodass nach 13 Wochen besonders bei hohen Konzentrationen zwar große Knochenareale auszumachen waren, diese Areale neu gebildeten Knochens jedoch mehrheitlich im benachbarten Muskelgewebe lagen und den Polylaktidträger nicht durchsetzten.

Bei den mit VEGF und rhBMP-2 beladenen Polylaktidträgern zeigten sich zwischen den beiden Applikationsarten ähnliche qualitative und quantitative Unterschiede. Histomorphometrisch ergaben sich signifikante Unterschiede bei den Konzentrationskombinationen 6 + 24 µg und 1,5 + 48 µg. Bei beiden Konzentrationskombinationen war mehr Knochen bei den Polylaktidträgern mit integriertem VEGF und rhBMP-2 entstanden. Bei den Konzentrationskombinationen 1,5 + 24 µg und 6 + 48 µg waren die Unterschiede zwischen „aufgetropft“ und „inkorporiert“ zwar nicht signifikant, doch war auch hier festzustellen, dass die Standardabweichungen bei den Polylaktidimplantaten mit aufgetropfter Wachstumsfaktorlösung deutlich höher waren als bei den Trägern mit integriertem VEGF und rhBMP-2. Diese Ergebnisse legen nahe, dass mit Polylaktidträgern mit inkorporierten Wachstumsfaktoren eine kontrolliertere und zuverlässigere Induktion der ektopen Knochenneubildung möglich ist. Diese Tatsache wurde auch in den Schliﬀpräparaten deutlich. So bildete sich bei den Polylaktidimplantaten mit inkorporiertem Kombinationspräparat konzentrationsabhängig zunächst randständig und nur vereinzelt innerhalb des Trägers Knochengewebe neu. Im weiteren Verlauf zeigten die Präparate eine zunehmende Durchsetzung der Polylaktidträger mit Knochengewebe. Im Gegensatz dazu war in Schliﬀpräparaten der Polylaktidträger mit aufgetropften Wachstumsfaktoren die randständige Lokalisation des neu gebildeten Knochengewebes mit Tendenz zur Ausdehnung in das benachbarte Muskelgewebe erkennbar. In manchen Präparaten wiesen die neu gebildeten Knochenareale keinen Kontakt zum Polylaktidimplantat auf. Eine Durchwachsung des Trägers wie bei den Polylaktidimplantaten mit inkorporierten Wachstumsfaktoren fand hier nicht statt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der in dieser Studie durchgeführte Vergleich zwischen den Applikationsmethoden von Wachstumsfaktoren zur Induktion der ektopen Knochenneubil-

dung die bekannten Vorteile der kontrollierten und retardierten Freisetzung aus durch CO₂-Hochdruckbegasung hergestellten Polylaktidimplantaten unterstreicht. Die Inkorporation der Wachstumsfaktoren und die schrittweise Freisetzung aus dem sich zersetzenden Polylaktidmaterial scheinen zu einer kontrollierteren Knochenneubildung zu führen, die weitgehend auf den Bereich des Polylaktidimplantates beschränkt bleibt und sich nicht wie beim Auftropfen der Wachstumsfaktorlösung unkontrolliert in das umgebende Weichgewebe ausdehnt. Die Inkorporation von Wachstumsfaktoren in eine Polylaktidmatrix durch CO₂-Hochdruckbegasung ist daher weiterhin das Mittel der Wahl bei der Beladung von Polylaktidträgern mit Wachstumsfaktoren.

4.2.2 Modifikation der Polylaktidimplantate mit Kalziumkarbonat und Knochenneubildung

Polymere wie Polylaktid werden *in vivo* durch langsame Hydrolyse der Esterbindungen in ihre Monomere zerlegt, die vom Organismus weiter verstoffwechselt und ausgeschieden werden können (Kulkarni et al. 1971, 1966, Schiller et al. 2004). Hierbei kommt es während des Degradationsprozesses der Polylaktidmatrix zu einem Abfall des pH-Wertes durch saure Abbauprodukte. Schliephake et al. konnten zeigen, dass es während der Degradation der Polylaktidimplantate nach 13 bis 14 Wochen zu einem Abfall des pH-Wertes in der Umgebung des Implantates kommt. Nach etwa 18 Wochen wird mit einem pH-Wert von 3 der Tiefpunkt erreicht und im Anschluss kommt es zur Normalisierung des pH-Wertes (Schliephake et al. 2007). Diese Tatsache zeigte sich auch in *in vivo* Untersuchungen, in denen *critical size defects* im Unterkiefer der Ratte mittels mit rhBMP-2 beladener Polylaktidimplantate behandelt wurden. Dabei kam es bei Implantaten mit 96 µg rhBMP-2 über den gesamten Beobachtungszeitraum von 26 Wochen zur Knochenneubildung. In der niedrigeren Konzentrationsgruppe mit 48 µg rhBMP-2 hingegen war nach 6 Wochen um die Polylaktidimplantate herum Knochenneubildung festzustellen, welche jedoch nach 13 Wochen signifikant abnahm, sodass nach 26 Wochen keine Knochenneubildung mehr erkennbar war. Schliephake et al. führten diese Abnahme der Knochenneubildung auf den in der *In-vitro*-Studie analysierten Abfall des pH-Wertes in der Umgebung der Polylaktidimplantate zurück (Schliephake et al. 2008).

2009 untersuchten Gruber et al. neben der Freisetzungskinetik durch *gas foaming* hergestellter Polylaktidimplantate auch ihr Potential, Knochenneubildung im ektopen Tiermodell zu induzieren. Sie beobachteten, dass es nur bei der hohen Konzentrationsgruppe mit 96 µg zu ektoper Knochenneubildung kam. Sie schlussfolgerten in Kombination mit den Ergebnissen der *In-vitro*-Untersuchungen daraus, dass zur erfolgreichen Induktion von Knochenneubildung Release-Raten von über 100 ng/72h über einen längeren Zeitraum notwendig seien. Weiterhin waren in der Umgebung der Polylaktidimplantate Entzündungsreaktionen festzustellen, die sie neben möglicher Bewegungen des benachbarten Muskelgewebes ebenfalls auf den Abfall des pH-Wertes im Zuge der Degradation der Polylaktidmatrix zurückführten. Die dadurch möglicherweise hervorgerufene, negative Auswirkung auf die Osteoneogenese erfordert eine Modifikation des Polylaktidmaterials (Gruber et al. 2009). Schiller et al. entwickelten Implantate aus einer Kombination von Polylaktid und karbonathaltigem Kalziumphosphat. Damit erreichten sie eine Abpufferung der sauren Degradationsprodukte durch materialinterne anorganische Füllstoffe. Dabei erwies sich karbonathaltiges

Kalziumphosphat in Langzeit-*in-vitro*-Studien als geeignetes Material. Die Biokompatibilität wurde *in vitro* an Zellkulturen aus humanen Osteoblasten überprüft (Schiller et al. 2004).

Die Integration der Kalziumkarbonatpartikel in das Polylaktidmaterial kann entweder über ein Verfahren erfolgen, bei dem beide Materialien mithilfe eines organischen Lösungsmittels verflüssigt und zur einer Lösung verarbeitet werden, die dann präzipitiert, oder über ein lösungsmittelfreies, trockenes und mechanisches Verfahren. Der große Nachteil des erstgenannten Verfahrens ist die mögliche eingeschränkte Biokompatibilität der gefertigten Scaffolds aus PDLLA und Kalziumkarbonat durch im Material verbliebenes Lösungsmittel, welches beim Degradationsprozess der Scaffolds freigesetzt werden kann. Schliephake et al. konnten zeigen, dass es zum einen möglich ist, Polylaktidträger aus PDLLA und Kalziumkarbonat mithilfe eines lösungsmittelfreien Verfahrens herzustellen und zum anderen, dass diese im Hinblick auf die Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren sogar ein signifikant verbessertes Verhalten aufweisen (Schliephake et al. 2015).

In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls mit Kalziumkarbonat modifizierte Polylaktidimplantate zur Induktion der ektopen Knochenneubildung verwendet, die mithilfe des lösungsmittelfreien Herstellungsverfahrens gefertigt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, diese Implantate mit Wachstumsfaktoren zu beladen und eine ektopye Knochenneubildung hervorzurufen. Im Gegensatz zur Studie von Gruber et al. kam es in dieser Studie auch bei den Konzentrationen von 48 µg rhBMP-2 und 24 µg rhBMP-2 zu einer signifikanten Knochenneubildung. Die Osteoneogenese wurde nicht durch saure Degradationsprodukte gestört, da diese durch die Kalziumkarbonatpartikel abgepuffert wurden. Auch eine Fremdkörperreaktion konnte nicht beobachtet werden. Mehrheitlich hatten die Areale neu gebildeten Knochens Kontakt mit dem Polylaktidmaterial bzw. durchsetzten es besonders zum späteren Beobachtungszeitpunkt. Ein fehlender Kontakt zur Oberfläche des Implantates und eine Ausbreitung des neu gebildeten Knochengewebes in das benachbarte Muskelgewebe, wie vereinzelt beobachtet, war auf eine Applikation durch intraoperatives Auftropfen der Wachstumsfaktoren zurückzuführen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf eine gute Biokompatibilität und ein gutes Degradationsverhalten der mit Kalziumkarbonat modifizierten Polylaktidimplantate *in vivo* hindeuten. Die Integration des anorganischen Füllstoffes Kalziumkarbonat in das Polylaktidmaterial scheint auch *in vivo* zu einer Abpufferung der sauren Degradationsprodukte zu führen, was eine ungestörte, ektopye Knochenneubildung zur Folge hat.

5 Zusammenfassung

Die Therapie von großen Knochendefekten wie sie z.B. nach der Resektion von Tumoren entstehen, stellen für den Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen nach wie vor ein schwieriges kuratives Problem dar. Hierbei gilt als „Goldstandard“ die Transplantation autologen Knochens, d.h. die Deckung des Knochendefektes durch körpereigenes Knochenmaterial, welches von anderer Stelle des Körpers des Patienten entnommen wurde. Abhängig von der Entnahmeregion und des Knochendefektes bzw. der dadurch bedingten notwendigen Menge entnommenen Knochens kann die Entnahmeoperation zu einer Vielzahl an Komplikationen führen und bedeutet für den Patienten eine zusätzliche Belastung und ein zusätzliches Risiko. Wachstumsfaktor-basierte Forschungsansätze im Bereich des Tissue Engineering eröffnen neue Möglichkeiten der regenerativen Therapie von Knochendefekten ohne die Notwendigkeit von Knochentransplantaten. rhBMP-2 hat sich dabei als besonders wirksamer Wachstumsfaktor zur Knochenneubildung herausgestellt. Im Fokus zahlreicher Studien steht die Suche nach der optimalen Dosierung des Wachstumsfaktors und der Applikation mittels eines geeigneten Trägermaterials.

Ziel dieser Studie war es, zum einen zu überprüfen, ob sich durch die kombinierte Gabe der Wachstumsfaktoren VEGF und rhBMP-2 der Wachstumsfaktor rhBMP-2 einsparen lässt und zum anderen, ob es zu einer qualitativ und quantitativ verbesserten ektopen Knochenneubildung im Vergleich zur isolierten Gabe von rhBMP-2 kommt. Es stellte sich zudem die Frage, ob sich die Inkorporation der Wachstumsfaktoren in das Polylaktidmaterial durch CO₂-Hochdruckbegasung vorteilhaft auf die ektopen Knochenneubildung auswirkt. Dazu wurden männlichen Wistar-Ratten mit Kalziumkarbonat-modifizierte Polylaktidträger in den Glutealmuskel implantiert. Die Polylaktidträger wurden durch CO₂-Hochdruckbegasung (*gas foaming*) entweder ausschließlich mit rhBMP-2 (3 Konzentrationsstufen), ausschließlich mit VEGF (3 Konzentrationstufen) oder mit einer Kombination aus VEGF und rhBMP-2 (4 Konzentrationskombinationen) beladen. Nach bestimmten Zeitintervallen (4 und 13 Wochen) wurden die Tiere geopfert und die Präparate entnommen. Es folgte die Herstellung von Schliffpräparaten und die Färbung derselbigen nach der Methode von Smith-Karagianes. Nach dem Einscannen der Schliffpräparate in den Computer schloss sich die histomorphometrische Auswertung an.

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung und die Begutachtung der histologischen Schliffpräparate zeigen, dass es möglich ist, durch die gleichzeitige Applikation von VEGF und rhBMP-2 ektop Knochenneubildung zu induzieren. Sie weisen jedoch auch daraufhin, dass VEGF in diesem Tiermodell keinen entscheidenden positiven Einfluss auf die Knochenneubildung während des beobachteten Zeitraumes besaß. So konnte rhBMP-2 durch die Zugabe von VEGF nicht eingespart werden.

5 Zusammenfassung

Des Weiteren weisen die Ergebnisse daraufhin, dass die Modifikation des Polylaktidmaterials durch den anorganischen Füllstoff Kalziumkarbonat zu einer im Vergleich zu früheren Studien ungestörten Knochenneubildung führt. Außerdem scheint die Inkorporation der Wachstumsfaktoren in das Polylaktidmaterial durch *gas foaming* eine kontrollierte Knochenneubildung hervorzurufen, die auf das Polylaktidimplantat beschränkt bleibt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, durch die kombinierte Applikation von VEGF und rhBMP-2 Knochenneubildung in der ektopen Region der Ratte hervorzurufen. Hierbei spielt sowohl das Trägermaterial mit seinen spezifischen Eigenschaften als auch die Art seiner Beladung mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle. Die Zugabe anderer die Knochenbildung positiv beeinflussender Wachstumsfaktoren zum gut erforschten rhBMP-2 und ihre kombinierten Wirkungen müssen in zukünftigen Studien weiter erforscht werden. Gelingt es, die kombinierte Wirkung mehrerer Wachstumsfaktoren besser zu verstehen und zu nutzen, eröffnet sich die Möglichkeit einer noch effektiveren Induktion der Knochenneubildung.

6 Literaturverzeichnis

Abdennagy B, Hott M, Marie PJ (1992): Effect of platelet-derived growth factor on human and mouse osteoblastic cells isolated from the trabecular bone surface. *Cell Biol Int Rep* 16, 235–247

Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D (1993): Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 53, 97–102

Arosarena OA, Collins WL (2005 a): Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: A comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 592–597

Arosarena OA, Collins WL (2005 b): Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. *Orthod Craniofac Res* 8, 267–276

Axhausen G (1907): Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen. *Dtsch Z Chir* 91, 388–428

Axhausen W (1952): Die Knochenregeneration, ein zweiphasisches Geschehen. *Zbl Chir* 77, 435–442

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999): Perspective-Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14, 1805–1815

Bar-Shavit Z (2007): The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 1130–1139

Barth A (1893): Ueber histologische Befunde nach Knochenimplantationen. *Arch Klin Chir* 46, 409–417

Bauer T, Muschler GF (2000): Bone graft materials. *Clin Orthop* 371, 10–27

Boden SD, McCuaig K, Hair G, Racine M, Titus L, Wozney JM, Nanes MS (1996): Differential effects and glucocorticoid potentiation of bone morphogenetic protein action during rat osteoblast differentiation in vitro. *Endocrinology* 137, 3401–3407

Bonewald LF, Johnson ML (2008): Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42, 606–615

Bostrom MPG, Asnis P (1998): Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop* 355S, 124–131

Boyan BD, Lohmann CH, Somers A, Niederauer GG, Wozney JM, Dean DD, Carnes Jr. DL, Schwartz Z (1999): Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for

6 Literaturverzeichnis

- recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 46, 51–59
- Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly L, Alder M, Nummikoski P (1997): A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 17, 10–25
- Bruder SP, Fox BS (1999): Tissue engineering of bone-cell based strategies. *Clin Orthop* 367S, 68–83
- Burchardt H (1983): The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 174, 28–42
- Burg KJL, Porter S, Kellam JF (2000): Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21, 2347–2359
- Civitelli R (2009): Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473, 188–192
- Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H (2000): Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 71, 1241–1257
- Cornell CN, Lane JM (1992): Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop* 277, 297–311
- Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG (1995): Bone tissue engineering. *Nat Med* 1, 1322–1324
- Dai J, Rabie ABM (2007): VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 86, 937–949
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS (2008): The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61, 577–587
- Deckers MML, Van Bezooijen RL, Van der Horst G, Hoogendam J, Van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545–1553
- DeLong WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T (2007): Bone graft and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery-a critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89A, 649–658
- Desai BJ, Meyer MH, Porter S, Kellam JF, Meyer RA (2003): The effect of age on gene expression in adult juvenile rats following femoral fracture. *J Orthop Trauma* 17, 689–698
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000): The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501–1504
- Eppley BL, Doucet M, Connolly DT, Feder J (1988): Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 46, 391–398

6 Literaturverzeichnis

- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4–25
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669–676
- Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2003): In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg* 14, 324–332
- Finkemeier CG (2002): Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84A, 454–464
- Friedlaender GE (1983): Immune responses to osteochondral allografts. *Clin Orthop* 174, 58–68
- Friess W, Uludag H, Foskett S, Biron R, Sargeant C (1999): Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers. *Int J Pharm* 187, 91–99
- Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, Ogawa Y, Lizuka T (1995): Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 316–322
- Garrel TV, Gotzen L (1998): Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking. *Unfallchirurg* 101, 713–727
- Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA (1995): Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3, 1–8
- Giannobile WV (1996): Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 19, 23–37
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005): Bone substitutes: an update. *Injury* 36, 20–27
- Gittens SA, Uludag H (2001): Growth factor delivery for bone tissue engineering. *J Drug Target* 9, 407–429
- Globus RK, Plouet J, Gospodarowicz D (1989): Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* 124, 1539–1547
- Gospodarowicz D (1991): Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 638, 1–8
- Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield MLVH (1997): Autogenous iliac crest bone graft. *Clin Orthop* 339, 76–81
- Groeneveld EHJ, Van den Bergh JPA, Holzmann P, Ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH (1999): Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevation graft with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 10, 499–509
- Gruber R, Weich HA, Dullin C, Schliephake H (2009): Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactid acid and rhBMP-2. *Clin Oral Impl Res* 20, 24–30

6 Literaturverzeichnis

- Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UME (2007): Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol* 34, 444–451
- Hanks CT, Wataha JC, Sun Z (1996): In vitro model of biocompatibility: a review. *Dent Mater* 12, 186–193
- Harada S, Rodan GA (2003): Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349–355
- Hausmann MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001): Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29, 560–564
- Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P (1997): TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471
- Hench LL, Polak JM (2002): Third generation biomedical materials. *Science* 295, 1014–1017
- Herr G, Schmid U (2001): Wirkung verschiedener Verfahren zur Keiminaktivierung auf die BMP-Aktivität von Knochengewebe. *Trauma Berufskrankh* 3, 288–292
- Hierner R, Täger G, Nast-Kolb D (2009): Die vaskularisierte Knochentransplantation. *Unfallchirurg* 112, 405–418
- Hile DD, Amirpour ML, Akgerman A, Pishko MV (2000): Active growth factor delivery from poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂. *J Controlled Release* 66, 177–185
- Hollinger JO, Battistone GC (1986): Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop* 207, 290–305
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990): The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery* 1, 1–69
- Horch HH, Pautke C (2006): Regeneration statt Reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10, 213–220
- Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA (1995): The effects of bone morphogenetic protein-2, -4 and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology* 136, 2671–2677
- Hutmacher DW (2000): Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529–2543
- Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, Yamano Y, Kato Y, Koike T (1998): Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int* 63, 490–495

6 Literaturverzeichnis

- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997): Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 36, 17-28
- Jakob F, Seefried L, Ebert R (2008): Pathophysiologie des Knochenstoffwechsels. *Internist* 49, 1159-1169
- Joshi A, Kostakis GC (2004): An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. *Br Dent J* 196, 167-171
- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990): Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110, 2195-2207
- Junqueira LCU, Carneiro J: *Histologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag Heidelberg, München 2004
- Karp JM, Rzesutek K, Shoichet MS, Davies JE (2003): Fabrication of precise cylindrical three-dimensional tissue engineering scaffolds for in vitro and in vivo bone engineering applications. *J Craniofac Surg* 14, 317-323
- Kaveh K, Ibrahim R, Bakar MZA, Ibrahim TA (2010): Bone grafting and bone graft substitutes. *J Anim Vet Adv* 6, 1055-1067
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998): Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49-61
- Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, Matsumoto T (1994): Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135, 774-781
- Kessler P, Thorwarth M, Bloch-Birkholz A, Nkenke E, Neukam FW (2005): Harvesting of bone from the iliac crest-comparison of the anterior and posterior sites. *Br J Oral Maxillofac Surg* 43, 51-56
- Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE (2006): Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 1, 7-19
- Kübler NR (1997): Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1, 2-25
- Kübler NR, Will C, Depprich R, Betz T, Reinhart E, Bill JS, Reuther JF (1999): Vergleichende Untersuchungen zur Sinusbodenelevation mit autogenem oder allogenen Knochengewebe. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3, 53-60
- Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonhard F (1966): Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg* 93, 839-843
- Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F (1971): Biodegradable poly(lactic acid) polymers *J Biomed Mater Res* 5, 169-181

6 Literaturverzeichnis

- Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ (2006): Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 27, 3249–3255
- Leriche R, Policard A (1926): *La physiologie normale et pathologique de l'os*. Masson et Cie, Paris
- Levander G (1938): A study of bone regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 67, 705–714
- Lexer E (1911): Über freie Transplantationen. *Langenbecks Arch Chir* 95, 827–851
- Lexer E (1929): Knochenbildung im Bindegewebe osteoplastischer Herkunft. *Dtsch Z Chir* 217, 1–32
- Liebermann JR, Daluiski A, Einhorn TA (2002): The role of growth factors in the repair of bone—biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84, 1032–1044
- Lindner JE, Henry SL (1992): Autogenous corticocancellous bone grafting: the standard technique. *Techniques Orthop* 7, 7–16
- Liu X, Ma PX (2004): Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 32, 477–486
- Livingston T, Ducheyne P, Garino J (2002): In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 62, 1–13
- Ma PX, Choi JW (2001): Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering* 7, 23–33
- Massagué J (1996): TGF- β signaling: Receptors, transducers, and mad proteins. *Cell* 85, 947–950
- Massagué J (1998): TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791
- Mayr-Wohlfahrt U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Günther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30, 472–477
- Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN, Vacanti JP (1994): Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 35, 1068–1077
- Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998): Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Res* 291, 1–11
- Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001): Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71, 354–361
- Mori S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Ueda T, Funai H, Kato M, Takaoka K (1998): Antiangiogenic agent (TNP-470) inhibition of ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *Bone* 22, 99–105

6 Literaturverzeichnis

- Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ (2004): Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83, 204–210
- Nerem RM, Sambanis A (1995): Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1, 3–13
- Nkenke E, Radespiel-Tröger M, Wiltfang J, Schultz-Mosgau S, Winkler G, Wilhelm F, Neukam FW (2002): Morbidity of harvesting of retromolar bone graft: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 13, 514–521
- Noble BS, Reeve J (2000): Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 159, 7–13
- Ollier L: *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Victor Masson et fils, Paris 1867
- Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG (2009): Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med* 15, 208–216
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007): Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13, 1–10
- Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1998): Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 43, 422–427
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L (1994): Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* 15, 173–180
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008
- Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S (2012): Knochenersatz: Transplantate und Ersatzmaterialien-ein Update. *Unfallchirurg* 115, 938–949
- Ripamonti U, Duneas N, Van den Heever B, Bosch C, Crooks J (1997): Recombinant transforming growth factor- β 1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (Bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* 12, 1584–1595
- Roberts AB, Sporn MB (1993): Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth Factors* 8, 1–9
- Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB (1987): Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) in vitro. *J Cell Biol* 105, 457–463
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010): Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21, 1457–1469

6 Literaturverzeichnis

- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF (1986): The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46, 155-169
- Sachlos E, Czernuska JT (2003): Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 5, 29-40
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004): Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4, 743-765
- Schenk R, Willenegger H (1963): Zum histologischen Bild der sogenannten Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund. *Experientia* 19, 593-595
- Schenk R, Willenegger H (1964): Zur Histologie der primären Knochenheilung. *Langenbecks Arch Surg* 308, 440-452
- Schieker M, Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, Milz S, Mutschler W (2004): Tissue engineering von Knochen-Integration und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell. *Orthopäde* 33, 1354-1360
- Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W (2006): Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering. *Eur J Trauma* 32, 114-124
- Schiller C, Rasche C, Wehmöller M, Beckmann F, Eufinger H, Epple M, Weihe S (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: Tissue Engineering and Reconstruction. In: L Andersson, KE Kahnberg, MA Pogrel: Oral and Maxillofacial Surgery. 1st edition, Wiley-Blackwell, Singapore 2010 a, 1125-1148
- Schliephake H (2010 b): Application of bone growth factors-the potential of different carrier systems. *J Oral Maxillofac Surg* 14, 17-22
- Schliephake H, Weich HA, Schulz J, Gruber R (2007): In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *J Biomed Mater Res* 83A, 455-462
- Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S (2008): Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid-an experimental study in rats. *Biomaterials* 29, 103-110
- Schliephake H, Vucak M, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M (2015): Solvent free production of porous PDLA/calcium carbonate composite scaffolds improves the release of bone growth factors. *Oral Maxillofac Surg* 19, 133-141
- Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009): Tissue Engineering von Knochengewebe-Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Unfallchirurg* 112, 785-795

6 Literaturverzeichnis

- Schwenzer N, Ehrenfeld M: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, München 2010
- Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K, Soo C, James AW (2012): Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev* 21, 655-667
- Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG (2001): Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581-2593
- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ (1988): Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175, 266-276
- Sittinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996): Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 17, 237-242
- Smith LG, Karagianes MT (1974): Histological preparation of bone to study ingrowth into implanted materials. *Calcif Tissue Res* 14, 333-337
- Soldner E, Herr G (2001): Knochen, Knochen transplantate und Knochenersatzmaterialien. *Trauma Berufskrankh* 3, 256-269
- St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, Hilibrand A (2003): Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop* 32, 18-23
- Steffens GCM, Yao C, Prével P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, Pallua N (2004): Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng* 10, 1502-1509
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Ferrara Jr. N, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Van Bruggen N, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9656-9661
- Tanaka H, Liang T (1995): Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *J Cell Physiol* 164, 367-375
- Teitelbaum SL (2000): Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508
- Teitelbaum SL, Ross FP (2003): Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4, 638-649
- Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J (1999): Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46, 193-202

6 Literaturverzeichnis

- 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 (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899
- Urist MR, Strates BS (1971): Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50, 1392-1406
- Urist MR, Mikulski A, Lietze A (1979): Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1828-1832
- Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM (1983): Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220, 680-686
- Vacanti JP, Langer R (1999): Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Mol Med* 354, 32-34
- Van den Bergh JPA, Ten Bruggenkate CM, Groeneveld HHJ, Burger EH, Tuinzing DB (2000): Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. *J Clin Periodontol* 27, 627-636
- Van Meekeren J: Heel en geneeskunstige aanmerkingen. Commelijin, Amsterdam 1668
- Von der Mark K, Gauss V, Von der Mark H, Müller P (1977): Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267, 531-532
- Wang JS (1996): Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand* 67, 1-33
- Welsch U: Lehrbuch Histologie. 3. Auflage; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München 2010
- Wermke M, Kunkel-Razum K, Scholze-Stubenrecht W: Duden: Das Fremdwörterbuch. 10. Auflage; Bibliographisches Institut GmbH, Mannheim 2010
- Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM (2001): Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 53, 1427-1437
- Winn SR, Uludag H, Hollinger JO (1999): Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 367, 95-106
- Wozney JM (2002): Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27, 2-8
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534

6 Literaturverzeichnis

Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S (1996): Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220, 366–371

Yang XB, Whitaker MJ, Sebald W, Clarke N, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo ROC (2004): Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Eng* 10, 1037–1045

Yao C, Roderfeld M, Rath T, Roeb E, Bernhagen J, Steffens G (2006): The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices. *Biomaterials* 27, 1608–1616

Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, Wozney JM, Hollinger JO (1997): Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J Bone Joint Surg Am* 79, 1778–1790

7 Anhang

7.1 Statistische Auswertung

7.1.1 Globaler Test

Einflussgröße	p-Wert
Zeit	<0,0001
Applikationsart	0,0240
Zeit*Applikationsart	0,2210
Konzentration	<0,0001
Zeit*Konzentration	<0,0001

Tabelle 7.1: Signifikanz der verschiedenen Variablen

7.1.2 Paarvergleiche der Konzentrationen

Konzentration A	Konzentration B	p-Wert
1,5 + 24 µg	1,5 + 48 µg	0,0329
1,5 + 24 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	48 µg	0,6328
1,5 + 24 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	96 µg	0,0155
1,5 + 48 µg	24 µg	0,0008
1,5 + 48 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 48 µg	0,5598
1,5 + 48 µg	96 µg	1,0000
24 µg	48 µg	0,2096
24 µg	6 + 24 µg	1,0000
24 µg	6 + 48 µg	1,0000
24 µg	96 µg	0,0006
48 µg	6 + 24 µg	1,0000
48 µg	6 + 48 µg	1,0000
48 µg	96 µg	1,0000
6 + 24 µg	6 + 48 µg	1,0000

7 Anhang

6 + 24 µg	96 µg	1,0000
6 + 48 µg	96 µg	0,2418

Tabelle 7.2: Applikationsart = inkorporiert, Zeitpunkt = 4 Wochen

Konzentration A	Konzentration B	p-Wert
1,5 + 24 µg	1,5 + 48 µg	0,1182
1,5 + 24 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	48 µg	0,5875
1,5 + 24 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 48 µg	0,0051
1,5 + 24 µg	96 µg	0,0008
1,5 + 48 µg	24 µg	0,6986
1,5 + 48 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 24 µg	0,1405
1,5 + 48 µg	6 + 48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	96 µg	1,0000
24 µg	48 µg	1,0000
24 µg	6 + 24 µg	1,0000
24 µg	6 + 48 µg	0,2057
24 µg	96 µg	0,0567
48 µg	6 + 24 µg	0,4318
48 µg	6 + 48 µg	1,0000
48 µg	96 µg	1,0000
6 + 24 µg	6 + 48 µg	0,0273
6 + 24 µg	96 µg	0,0071
6 + 48 µg	96 µg	1,0000

Tabelle 7.3: Applikationsart = inkorporiert, Zeitpunkt = 13 Wochen

Konzentration A	Konzentration B	p-Wert
1,5 + 24 µg	1,5 + 48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	96 µg	0,1436
1,5 + 48 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	96 µg	0,0072

7 Anhang

24 µg	48 µg	0,7295
24 µg	6 + 24 µg	1,0000
24 µg	6 + 48 µg	1,0000
24 µg	96 µg	<0,0001
48 µg	6 + 24 µg	1,0000
48 µg	6 + 48 µg	1,0000
48 µg	96 µg	0,0019
6 + 24 µg	6 + 48 µg	1,0000
6 + 24 µg	96 µg	<0,0001
6 + 48 µg	96 µg	0,0766

Tabelle 7.4: Applikationsart = aufgetropft, Zeitpunkt = 4 Wochen

Konzentration A	Konzentration B	p-Wert
1,5 + 24 µg	1,5 + 48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 24 µg	1,0000
1,5 + 24 µg	6 + 48 µg	0,9032
1,5 + 24 µg	96 µg	0,2407
1,5 + 48 µg	24 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	6 + 24 µg	0,0250
1,5 + 48 µg	6 + 48 µg	1,0000
1,5 + 48 µg	96 µg	0,5675
24 µg	48 µg	1,0000
24 µg	6 + 24 µg	1,0000
24 µg	6 + 48 µg	0,0623
24 µg	96 µg	0,0177
48 µg	6 + 24 µg	0,0309
48 µg	6 + 48 µg	0,5121
48 µg	96 µg	0,1231
6 + 24 µg	6 + 48 µg	0,0017
6 + 24 µg	96 µg	0,0008
6 + 48 µg	96 µg	1,0000

Tabelle 7.5: Applikationsart = aufgetropft, Zeitpunkt = 13 Wochen

7.1.3 Vergleich der beiden Applikationsarten

Konzentration	p-Wert
24 µg	0,0103

7 Anhang

48 µg	0,0579
96 µg	0,2204
1,5 + 24 µg	0,1538
6 + 24 µg	0,0089
1,5 + 48 µg	0,0072
6 + 48 µg	0,1804

Tabelle 7.6: Signifikanz der Unterschiede zwischen den Applikationsarten für die jeweiligen Konzentrationen

7.2 Abbildungsverzeichnis

2.1	Polylaktidimplantat	20
2.2	PTFE-Form	21
2.3	Einbringen des Polylaktidträgers	25
2.4	Mikroskopiersystem dotSlide 2.0 Virtual Slide System (Bild mit freundlicher Genehmigung von Olympus Europa SE & Co. KG)	29
2.5	Bildbearbeitung und -auswertung: Markierung und Ausschneiden des Polylaktidträgers; Markierung aller Areale neu gebildeten Knochens	30
3.1	Polylaktidträger mit 24 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen	31
3.2	Polylaktidträger mit 48 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen	31
3.3	Polylaktidträger mit 96 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 4 Wochen	32
3.4	Polylaktidträger mit 24 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen	32
3.5	Polylaktidträger mit 48 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen	32
3.6	Polylaktidträger mit 96 µg inkorporiertem rhBMP-2 nach 13 Wochen	33
3.7	Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit inkorporiertem rhBMP-2	33
3.8	Polylaktidträger mit 24 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen	34
3.9	Polylaktidträger mit 48 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen	34
3.10	Polylaktidträger mit 96 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 4 Wochen	34
3.11	Polylaktidträger mit 24 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen	35
3.12	Polylaktidträger mit 48 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen	35
3.13	Polylaktidträger mit 96 µg aufgetropftem rhBMP-2 nach 13 Wochen	35
3.14	Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit aufgetropftem rhBMP-2	36
3.15	Polylaktidträger mit 0,24 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen	37
3.16	Polylaktidträger mit 1,5 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen	37
3.17	Polylaktidträger mit 6 µg inkorporiertem VEGF nach 4 Wochen	37
3.18	Polylaktidträger mit 0,24 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen	38
3.19	Polylaktidträger mit 1,5 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen	38
3.20	Polylaktidträger mit 6 µg inkorporiertem VEGF nach 13 Wochen	38

7 Anhang

3.21	Polylaktidträger mit 0,24 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen	39
3.22	Polylaktidträger mit 1,5 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen	39
3.23	Polylaktidträger mit 6 µg aufgetropftem VEGF nach 4 Wochen	39
3.24	Polylaktidträger mit 0,24 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen	40
3.25	Polylaktidträger mit 1,5 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen	40
3.26	Polylaktidträger mit 6 µg aufgetropftem VEGF nach 13 Wochen	40
3.27	Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	41
3.28	Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	41
3.29	Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	42
3.30	Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	42
3.31	Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	42
3.32	Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	43
3.33	Polylaktidträger mit inkorporiertem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	43
3.34	Polylaktidträger mit inkorporiertem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	43
3.35	Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit inkorporiertem VEGF und rhBMP-2	44
3.36	Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	45
3.37	Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	45
3.38	Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	45
3.39	Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 4 Wochen	46
3.40	Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	46
3.41	Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 24 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	47
3.42	Polylaktidträger mit aufgetropftem 1,5 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	47
3.43	Polylaktidträger mit aufgetropftem 6 + 48 µg-Kombinationspräparat nach 13 Wochen	47
3.44	Flächenanteil neu gebildeten Knochens (%) bei Polylaktidträgern mit aufgetropftem VEGF und rhBMP-2	48

3.45	Leerdefekt im Muskel nach 13 Wochen	49
3.46	Unbeladener Polylaktidträger nach 13 Wochen	49
3.47	Vergleich der Applikationsarten für rhBMP-2	50
3.48	Vergleich der Applikationsarten für die Kombinationspräparate	51
3.49	96 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)	53
3.50	48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 48 µg rhBMP-2)	54
3.51	48 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)	55
3.52	24 µg rhBMP-2 im Vergleich zum Kombinationspräparat (VEGF + 24 µg rhBMP-2)	56

7.3 Tabellenverzeichnis

2.1	Konzentrationsstufen/-kombinationen, Beobachtungsintervalle, Anzahl der Versuchstiere	23
2.2	Entwässerung, Intermedium und Immersion	27
7.1	Signifikanz der verschiedenen Variablen	77
7.2	Applikationsart = inkorporiert, Zeitpunkt = 4 Wochen	78
7.3	Applikationsart = inkorporiert, Zeitpunkt = 13 Wochen	78
7.4	Applikationsart = aufgetropft, Zeitpunkt = 4 Wochen	79
7.5	Applikationsart = aufgetropft, Zeitpunkt = 13 Wochen	79
7.6	Signifikanz der Unterschiede zwischen den Applikationsarten für die jeweiligen Konzentrationen	80

7.4 Abdruckgenehmigung

ABDRUCKGENEHMIGUNG

1. Erteilt von:

Firma: OLYMPUS EUROPA SE & Co. KG

Ansprechpartner: Herr Henrik van Düllen

Straße: Wendenstraße 14-18

PLZ/Ort: 20097 Hamburg

Telefon/Fax: 040 23773 3357

E-Mail: Henrik.vanDuellen@olympus-europa.com

2. Erteilt für:

Firma: Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Ansprechpartner: Jan Goldstein

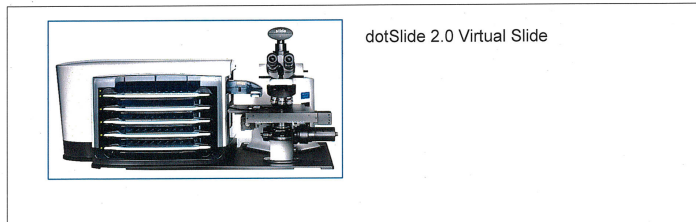
Straße: Robert-Koch-Straße 40

PLZ/Ort: 37075 Göttingen

Telefon/Fax: 0176/ 60836642

E-Mail: jan.goldstein@stud.uni-goettingen.de

3. Zu veröffentlichende Abbildung(en)/ Foto(s):



Lebenslauf

Ich wurde als Sohn von Willi Goldstein, Gymnasiallehrer, und Regina Sybert-Goldstein, Diplom-Pädagogin, am 25.10.1987 in Soest geboren. Ich habe eine Schwester, Dr. med. Julia Goldstein. Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Wiesegrundschule in Soest. In den Jahren 1998 bis 2007 war ich Schüler am Archigymnasium in Soest. Im Juni 2007 erlangte ich die allgemeine Hochschulreife.

Von Juli 2007 bis Ende Juni 2008 absolvierte ich im Rahmen des Zivildienstes ein Freiwilliges Soziales Jahr beim Regionalverband Soest/Hochsauerland der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V.

Im Wintersemester 2008 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, das ich im Dezember 2013 mit dem Staatsexamen und der Approbation zum Zahnarzt abschloss. Seit September 2014 bin ich in der Zahnarztpraxis Dr. Ahlers & Kollegen in Laaten als Assistenz Zahnarzt tätig.

Jan Goldstein

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Schliephake für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Moser, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke allen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe, mit denen ich die ein oder andere Stunde im Labor verbracht habe.

Für die Hilfestellung bei der Laborarbeit möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des Forschungsbereichs der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Uniklinikums Göttingen danken.

Frau Dr. Bunt und Herrn Dr. Rolf danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit mit dem Mikroskopie- und Scansystem.