

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

**Angiogene Auswirkung der retardierten Freisetzung von rh-BMP-2 und rh-VEGF
im Muskel der Ratte.**

Immunhistochemische Auswertung von CD31 und CD34

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Florian Obermeyer

aus
Bad Wildungen

Göttingen 2017

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. dent. R. Mausberg
Datum der mündlichen Prüfung: 05.02.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Angiogene Auswirkung der retardierten Freisetzung von rh-BMP-2 und rh-VEGF im Muskel der Ratte. Immunhistochemische Auswertung von CD31 und CD34" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
Florian Obermeyer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Funktion der Blutgefäße	1
1.2 Aufbau der Gefäße	1
1.3 Gefäßneubildung.....	3
1.3.1 Vaskulogenese.....	3
1.3.2 Angiogenese	4
1.4 Wachstumsfaktoren.....	7
1.4.1 <i>Vascular endothelial growth factor</i>	8
1.4.1.1 VEGF Signalweg.....	9
1.4.1.2 Therapeutischer Einsatz von VEGF	9
1.4.2 <i>Bone morphogenetic protein</i>	10
1.4.2.1 BMP Signalweg	11
1.4.2.2 Gewinnung von BMP	12
1.4.2.3 Therapeutischer Einsatz von BMP.....	12
1.5 Trägermaterialien für Wachstumsfaktoren.....	13
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Versuchstiere	17
2.2 Versuchsgenehmigung.....	17
2.3 Herstellung der Polylaktidimplantate	17
2.4 Operation	21
2.5 Herstellung der Dünnschnitte.....	22
2.6 Immunfärbung.....	23
2.6.1 Antigendemaskierung	23
2.6.2 Färbung der Schnitte.....	23
2.6.2.1 CD31.....	23
2.6.2.2 CD34.....	24
2.6.3 Substrat-Chromogensystem und Gegenfärbung.....	25
2.7 Mikroskopie	25
2.8 Auswertung	26
2.9 Statistische Analyse.....	28
3 Ergebnisse.....	29
3.1 CD31-Antikörperfärbung.....	29
3.1.1 Wachstumsfaktor inkorporiert.....	29
3.1.1.1 VEGF	29
3.1.1.2 BMP	32
3.1.1.3 Kombination VEGF mit BMP	34
3.1.1.4 Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen die alleinige Gabe von BMP und VEGF	38
3.1.2 Wachstumsfaktor aufgetropft	40
3.1.2.1 VEGF	40
3.1.2.2 BMP	42
3.1.2.3 Kombination VEGF mit BMP	43

3.1.2.4	Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen VEGF und BMP allein	45
3.1.3	Vergleich Wachstumsfaktor inkorporiert gegen Wachstumsfaktor aufgetropft.....	49
3.2	CD34-Antikörperfärbung.....	51
3.2.1	Wachstumsfaktor inkorporiert.....	51
3.2.1.1	VEGF.....	51
3.2.1.2	BMP	53
3.2.1.3	Kombination VEGF mit BMP	57
3.2.1.4	Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen die alleinige Gabe von VEGF und BMP	58
3.2.2	Wachstumsfaktor aufgetropft	60
3.2.2.1	VEGF.....	60
3.2.2.2	BMP	62
3.2.2.3	Kombination VEGF mit BMP	63
3.2.2.4	Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen VEGF und BMP alleine	64
3.2.3	Vergleich Wachstumsfaktor inkorporiert gegen Wachstumsfaktor aufgetropft.....	68
4	Diskussion.....	69
5	Zusammenfassung	79
6	Anhang	82
7	Literaturverzeichnis.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Ang	Angiopoetin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
CD31	<i>cluster of differentiation 31</i>
CD34	<i>cluster of differentiation 34</i>
Co-Smad	<i>common mediator SMAD</i>
DAB	Diaminobenzidin-Farbstoff
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
<i>IL-8</i>	<i>interleukin-8</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
NO	Stickstoffmonoxid
<i>PIGF</i>	<i>placenta growth factor</i>
PLA	Polylaktid
PTFE	Poly-Tetra-Fluor-Ethylen
Smad	<i>Sma and Mad-related protein</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tie	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TTBS	<i>tris-buffered saline with tween 20</i> Puffer
Tween	Polysorbat
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor</i> <i>receptor</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herkunft von Gefäßen im adulten und embryonalen Organismus	4
Abbildung 2: Schema der Angiogenese.	5
Abbildung 3: BMP Signalweg.....	11
Abbildung 4: Poly-Tetra-Fluor-Ethylen-Platte	18
Abbildung 5: Implantate mit einem Durchmesser von 7 mm.....	19
Abbildung 6: eingelegtes Implantat in die präparierte Muskeltasche	21
Abbildung 7: Olympus Dotslide 2.1®.....	26
Abbildung 8: Übersicht Präparat	27
Abbildung 9: Auswahl der Messfelder	27
Abbildung 10: Referenzbereich	27
Abbildung 11: Beispielschnitte eines Auswertungsbereichs zur Darstellung der Unterschiede zwischen den Dosierungen nach 4 Wochen	29
Abbildung 12: CD31 VEGF inkorporiert.....	30
Abbildung 13: Nach 4 Wochen keine braun markierten Gefäße im Präparat, dagegen nach 13 Wochen wenige braun markierte Gefäße.....	32
Abbildung 14: CD31 BMP inkorporiert	33
Abbildung 15: Deutlich sichtbare Zunahme an braun markierten Gefäßen nach 13 Wochen Laufzeit.....	35
Abbildung 16: Erhöhung der VEGF Konzentration von 1,5 µg VEGF auf 6 µg VEGF bei gleicher Dosierung von BMP mit 48 µg nach 13 Wochen Implantationsdauer	36
Abbildung 17: CD31 Kombination VEGF mit BMP	36
Abbildung 18: CD31 VEGF aufgetropft	40
Abbildung 19: CD31 BMP aufgetropft.....	42
Abbildung 20: CD31 Kombination VEGF mit BMP	43
Abbildung 21: Beispielschnitte der Auswertungsbereiche der Kombination aus 6 µg VEGF mit 24 µg BMP im Vergleich zu 24 µg BMP und 48 µg BMP als Einzeldosis	46
Abbildung 22: Durch Aufgetropften beladene Trägern nach 4 Wochen mit signifikant mehr braun gefärbten Gefäßen.....	49
Abbildung 23: CD34 VEGF inkorporiert.....	51
Abbildung 24: Histologische Beispielschnitte ohne positiv markierte Bereiche bei 48 µg BMP nach 4 Wochen und vielen positiv markierten Gefäßen nach 13 Wochen Laufzeit	53
Abbildung 25: CD34 BMP inkorporiert	55
Abbildung 26: CD34 Kombination VEGF mit BMP	57
Abbildung 27: CD34 VEGF aufgetropft	60
Abbildung 28: CD34 BMP aufgetropft.....	62
Abbildung 29: CD34 Kombination VEGF mit BMP	63
Abbildung 30: 13 Wochen Implantationsdauer 96 µg BMP im Vergleich zur Kombination aus 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen und Zeiträume.....	20
Tabelle 2: Antigendemaskierung.....	23
Tabelle 3: Antikörperfärbung CD31.....	24
Tabelle 4: Antikörperfärbung CD34.....	24
Tabelle 5: Substrat-Chromogensystem und Gegenfärbung.....	25
Tabelle 6: Vergleich inkorporiert gegen aufgetropft.....	50
Tabelle 7: Vergleich inkorporiert gegen aufgetropft.....	68

1 Einleitung

1.1 Funktion der Blutgefäße

Blutgefäße dienen der Versorgung von Körperzellen mit Sauerstoff, Botenstoffen, Nährstoffen und dem Abtransport entstandener Stoffwechselprodukte. Das Herz ist der Antrieb für die Zirkulation des Blutes im Körper. Arterien, Venen und die Gefäße der Mikrozirkulation werden gemeinsam als Blutgefäße bezeichnet. Die Gefäße der Mikrozirkulation beginnen mit den Arteriolen, die eine Fortsetzung der Arterien darstellen, und sie münden in ein Netzwerk von Kapillaren, in denen der Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet. An die Kapillaren schließen sich die Venolen an, die zu Venen werden und das Blut zurück zum Herzen transportieren (Schiebler und Korf 2007).

1.2 Aufbau der Gefäße

Arterien und Venen bauen sich aus drei Wandschichten auf, die in ihrem Aufbau variieren.

Die innerste Schicht, die *Tunica intima*, ist zum Blut hin mit Endothel ausgekleidet. Die Endothelzellen bilden einen geschlossenen Verband sehr flacher Zellen und ruhen meist auf einer Basallamina. Sie können verschiedene Faktoren synthetisieren und so auf Reize mit einer Vasokonstriktion oder Vasodilatation reagieren.

Bei Verletzungen bilden die Endothelzellen Rezeptoren für angiogene Wachstumsfaktoren und fördern die Wundheilung in ihrer Umgebung.

An die Endothelzellen schließt sich ein Netzwerk aus elastischen Fasern und zarten Kollagenfasern, das subendotheliale Bindegewebe, an. Die *Tunica intima* kontrolliert den Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe.

Die mittlere Schicht, die *Tunica media*, besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern. Je nach Gefäßabschnitt variiert die

prozentuale Zusammensetzung als Anpassung auf die vorliegenden Verhältnisse. Die glatten Muskelzellen regulieren durch Kontraktion oder Dilatation den Blutfluss. Abschließend folgt die *Tunica adventitia*, ein Geflecht aus Kollagen und elastischen Fasern. Sie befestigt die Gefäße in ihrer Umgebung und kann durch die Längsanordnung der Fasernetzwerke auftretende Längsdehnungen abfangen.

Gefäße der Mikrozirkulation sind vielfältiger aufgebaut. Die Arteriolen gleichen im Aufbau den Arterien weitgehend, sind aber vom Lumendurchmesser kleiner (20-130 μm) und besitzen nur ein bis vier Schichten glatter Muskelzellen. Kapillaren sind noch kleiner (5-15 μm) und stark verzweigt. Ihr Wandaufbau ist an das jeweilige Gewebe angepasst; meist besteht er aber aus einem Endothel, einer Basallamina und Perizyten. Das Endothel mit seiner Basallamina ist je nach Organ und dessen Anforderungen kontinuierlich, fenestriert oder diskontinuierlich.

Die Venolen, mit einem etwas größeren Lumendurchmesser als die Kapillaren, enthalten bereits wieder glatte Muskelzellen und sind wie die Arteriolen in ihrem Durchfluss regulierbar. Beide nehmen damit Einfluss auf den Stoffaustausch und den systemischen Blutdruck. Reguliert wird der Durchstrom der Blutgefäße durch neuronale, hormonelle und lokale Signale (Schiebler und Korf 2007).

1.3 Gefäßneubildung

Die Gefäßneubildung wird in die beiden Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese unterteilt.

1.3.1 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Gefäßentstehung aus Endothelzellvorläufern und Angioblasten. Bereits zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass isolierte embryonale Zellen ein Blutgefäßnetzwerk bilden können (Joussen et al. 2003). Die Zelle, aus der sich alle Endothelzellen rekrutierten, wurde Angioblast genannt (siehe Abb. 1). Der gemeinsame Vorläufer von Endothelzellen und Zellen der hämatopoetischen Reihe wird als Hämangioblast bezeichnet (Choi 1998).

Die Differenzierung der pluripotenten Vorläuferzellen in Hämangioblasten wird durch Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF) induziert. Die ersten Oberflächenmarker, die sowohl auf der Oberfläche von Endothelzellen als auch von den hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert werden, sind *cluster of differentiation 31* (CD31), *cluster of differentiation 34* (CD34) und der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Typ 2 (VEGF-R2) für *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Yamaguchi et al. 1993).

Zunächst entsteht ein primitives Geflecht, welches sich durch Verstärkung bestimmter Gefäße und Rückbildung anderer in ein reifes Gefäßsystem differenziert (Risau 1997).

Dieser Prozess kann auch noch im Erwachsenenalter stattfinden und ist nicht, wie früher angenommen, auf die frühe Embryogenese beschränkt. Hierbei spielen endotheliale Stammzellen eine wichtige Rolle (Ashara et al. 1999, Heissig et al. 2002, Maisonpierre et al. 1997).

Am Beispiel der Tumorangiogenese zeigte sich, dass das Wachstum von Gefäßen ein Zusammenspiel aus Angiogenese und Vaskulogenese ist.

Zirkulierende Endothelzellvorläufer tragen hier zum Wachstum der Endothelzellmasse bei.

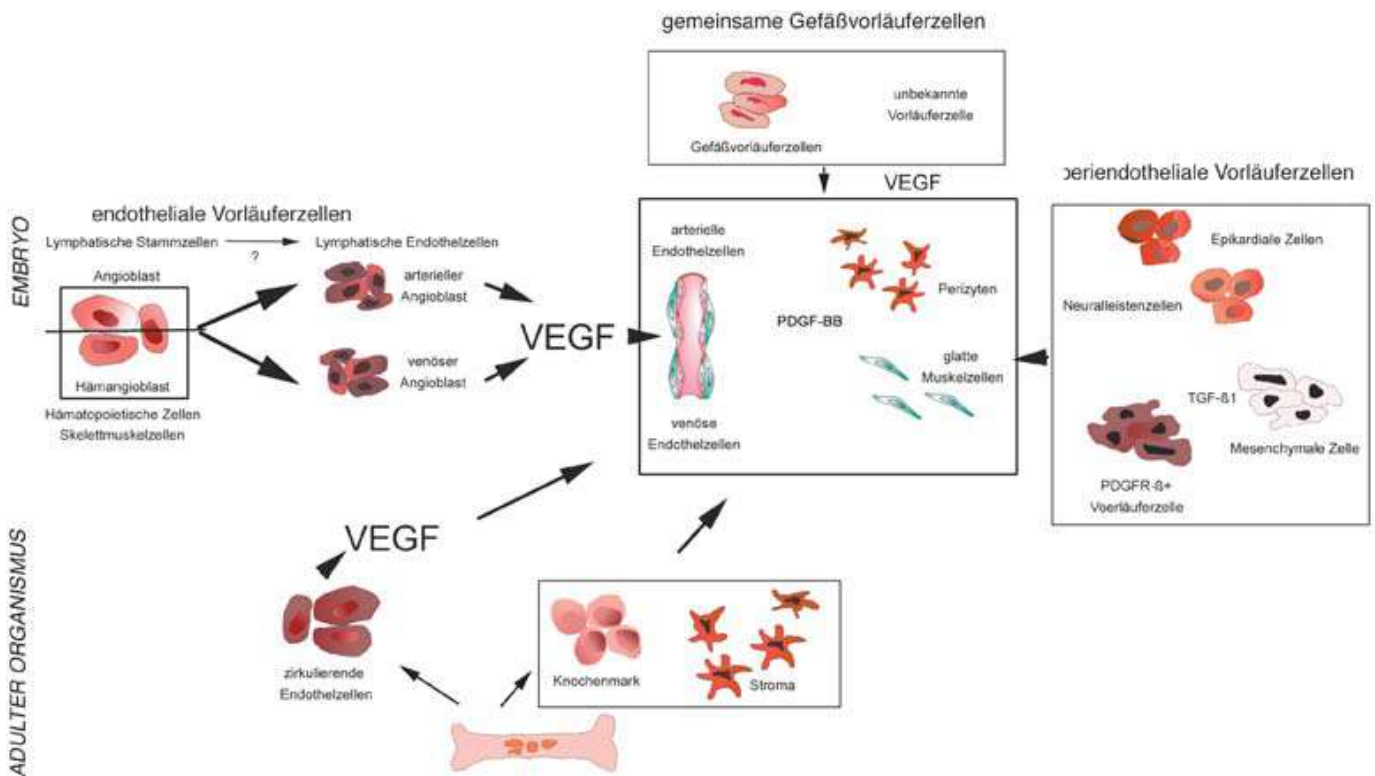


Abbildung 1: Herkunft von Gefäßen im adulten und embryonalen Organismus (Joussen et al. 2003. Nachdruck genehmigt. Siehe Anhang).

VEGF, VEGFR-2 und bFGF scheinen die postnatale Angioblastendifferenzierung zu unterstützen, wohingegen VEGFR-1 diese Differenzierung hemmt (Fong et al. 1999).

1.3.2 Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Aussprossung von Kapillaren aus bereits vorhandenen Gefäßen. Sowohl bei der Vaskulogenese als auch bei der Angiogenese differenzieren sich Zellen des umgebenden Mesenchyms zu Perizyten (bei Kapillaren) oder zu glatten Muskelzellen (bei Gefäßen mit größerem Querschnitt). Der Vorgang der Angiogenese verläuft schrittweise.

Zu Beginn erweitern sich die vorhandenen Gefäße und werden durchlässiger. Proteasen aus der Umgebung lösen das umgebende lockere Bindegewebe und die Basalmembran auf (siehe Abb. 2). Dieser Vorgang ermöglicht aktivierten Endothelzellen eine Migration in das umliegende Gewebe. Diese bilden ein neues Gefäßlumen.

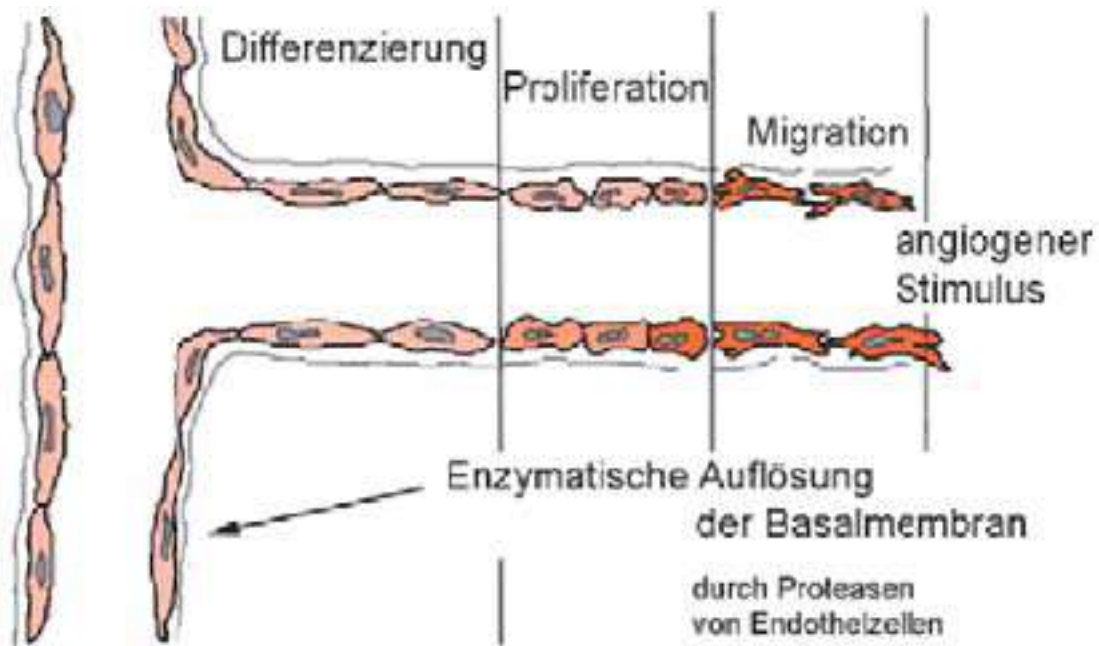


Abbildung 2: Schema der Angiogenese (Joussen et al. 2003. Nachdruck genehmigt. Siehe Anhang).

Die Vasodilatation zu Beginn der Neubildung der Gefäße erfolgt hauptsächlich als Antwort auf Stickstoffmonoxid. Es ist fähig, die Produktion von VEGF hochzuregulieren (Kimura et al. 2000), welches durch die Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie CD31 oder vaskulär-endotheliales Cadherin die Gefäßpermeabilität weiter steigert.

Angiopoietin-1 (Ang-1), ein Ligand des Endothelzellrezeptors *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains-2* (Tie-2), ist ein Antipermeabilitätsfaktor, wohingegen Ang-2 als Antagonist zu Ang-1 den Tie-2-Signalweg hemmt und so das Aussprossen von Endothelzellen verstärkt (Maisonpierre et al. 1997).

Ang-2, welches in Speichergranula von Endothelzellen nachgewiesen werden kann, ist verantwortlich dafür, dass sich glatte Muskelzellen von den Endothelzellen ablösen und sich die extrazelluläre Matrix auflöst. Für die Auflösung der Matrix werden Proteasen (Matrix-Metalloproteasen) benötigt. Diese schaffen nicht nur Platz für die migrierenden Endothelzellen, sondern sind auch Voraussetzung für die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (Bergers et al. 2000, Nelson et al. 2000).

Es sind über 20 dieser Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bekannt, die Einfluss auf die Zellproliferation und Angiogenese haben. Die MMPs werden durch gewebsständige Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP) beeinflusst. Durch die Freisetzung von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und eine gleichzeitige Hemmung von TIMP-2 kann Ang-1 eine Aussprossung von Endothelzellen initiieren, obwohl es sonst durch seine Hemmung des Tie-2-Signalweges diese Aussprossung reduziert (Kim et al. 2000).

Ist die extrazelluläre Matrix aufgelöst, lösen sich die Endothelzellen aus ihrem Verbund und setzen ein komplexes Zusammenspiel zwischen Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF, *hematopoietic growth factor*), Differenzierungsfaktoren (Angiopoetinen) und den jeweiligen Rezeptoren in Gang. Aktuell ist die Rolle von bFGF und VEGF auf die Angiogenese am besten untersucht, obwohl nicht auszuschließen ist, dass andere, weniger bekannte Faktoren eine ähnliche Rolle übernehmen.

Die gelösten Endothelzellen wachsen nun in die Matrix ein und bilden dort solide Zellstränge. Aus der Ausdünnung dieser Stränge entsteht das Gefäßlumen. Die Größe des Lumens wird durch VEGF-121 und VEGF-165 positiv beeinflusst. VEGF-189 hingegen führt zu einer Verkleinerung des Lumens. Haben sich neue Gefäße gebildet, müssen sich diese nun an ihr umgebendes Gewebe anpassen.

Der Erhalt der Endothelzellen scheint von VEGF und dessen Interaktion mit seinem Rezeptor VEGFR-2-abhängig zu sein. Bei fehlender Signaltransduktion kommt es zur Apoptose (Carmeliet et al. 1999).

Neben den genannten Faktoren spielt das umgebende Gewebe eine wichtige Rolle beim Erhalt der Gefäße. Diese periendotheliale Zellen beschränken die Proliferation und Migration des Endothels, bilden aber auch Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Peptide (Benjamin et al. 1998). Die Angiogenese im Organismus unterliegt einer strengen Regulation im Gleichgewicht zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Einflüssen (Peroulis et al. 2002). Im adulten Organismus teilen sich die Endothelzellen nur etwa alle drei Jahre. Zu einer physiologisch erhöhten Teilungsrate kommt es während der Wundheilung und der Schwangerschaft. Eine pathologisch erhöhte Teilungsrate tritt beim Tumorwachstum, bei der rheumatoiden Arthritis und bei der *Retinopathia diabetica* auf (Kroll und Waltenberger 2000, Murota et al. 2000).

Bei anderen Krankheiten, wie der diabetesassoziierten koronaren Herzerkrankung oder nach einem Myokardinfarkt, wäre eine verstärkte Angiogenese wünschenswert, tritt aber nicht ein.

1.4 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren gehören zu den Zytokinen. Dies sind Peptide, die Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zellfunktionen im gesamten Körper regulieren. In der Embryonalentwicklung entscheiden die Wachstumsfaktoren über die Größe der Zellen, ihre Differenzierung, die Proliferation und ob sie absterben oder bestehen bleiben.

Manche Faktoren, beispielsweise VEGF, besitzen chemotaktische Wirkung und bewirken ein gerichtetes Wachstum von Nerven und Kapillaren in Richtung des Konzentrationsgradienten.

Sie sind essentiell für die Zellproliferation und Differenzierung. Sie führen zur ständigen Erneuerung von Zellen in hoch regenerativen Geweben wie dem Darmepithel oder verschiedenen Blutzellen. Nervenzellen benötigen Wachstumsfaktoren, um nicht in die finale Phase der Apoptose überzutreten.

Nach Verletzungen sind die Wachstumsfaktoren für die Regeneration zuständig.

Zellen benötigen spezifische Oberflächenrezeptoren aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen oder Rezeptor-Serin/Threoninkinasen, um auf Zytokine zu reagieren (Hing 2004, Rassow et al. 2012).

1.4.1 *Vascular endothelial growth factor*

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist einer der am besten untersuchten Angiogenesefaktoren. Zunächst wurde es wegen seiner Freisetzung aus transplantiertem Tumorgewebe, in welchem es die Durchlässigkeit der Venolen für Makromoleküle erhöhte, auch *vascular permeability factor* (VPF) genannt (Ferrara und Davis-Smyth 1997, Senger et al. 1993). Darauf folgende Studien zeigten aber, dass VEGF die Angiogenese stimuliert (Breier et al. 1992, Phillips et al. 1990).

Neben VEGF sind weitere Faktoren wie FGF, *transforming growth factor- α* (TGF- α), TGF- β , *hepatocyte growth factor*, *tumor necrosis factor* (TNF)- α , Angiogenin und Interleukin (IL)-8 als positive Regulatoren der Angiogenese bekannt. Allerdings stellt VEGF meist den limitierenden Faktor für die Angiogenese dar und wird daher besonders intensiv erforscht.

VEGF beschreibt eine Familie aus verschiedenen Wachstumsfaktoren. Sie besteht aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und dem *placenta growth factor* (PGF). Die hier beschriebenen Vorgänge beziehen sich auf das zuerst entdeckte VEGF-A. VEGF-C und VEGF-D sind an der Regulierung der lymphatischen Angiogenese beteiligt. Die Funktion von PGF ist bisher weitgehend unbekannt.

Durch alternatives Exonspllicing der acht Exons des VEGF-A-Gens können sechs Isoformen erzeugt werden. Entsprechend der Anzahl von Aminosäuren werden diese Isoformen VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-183 und VEGF-206 genannt. VEGF-165 ist die dominante Isoform. Das stärkste Signal

für seine Expression ist die Hypoxie im Gewebe (Ferrara et al. 2003). Daneben können aber auch inflammatorische Zytokine wie IL-1b und IL-6 die Expression steigern. Ebenfalls dazu fähig sind die Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor*, TGF- α , TGF- β , IGF-1, FGF, und der *platelet-derived growth factor*.

1.4.1.1 VEGF Signalweg

Die Signalübertragung übernehmen der VEGFR-1- (Synonym: *fms-like tyrosine kinase*, FLT-1) und der VEGFR-2-Rezeptor (Synonym: *fetal liver kinase*, FLK-1). Bei Aktivierung des VEGFR-1 wird die Migration von Monozyten gefördert. Die Aktivierung von VEGFR-2 führt zur Proliferation von Endothelzellen, zur Expression von Proteasen, zur Steigerung der Gefäßpermeabilität und zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Ferrara et al. 2003, Jousen et al. 2003).

1.4.1.2 Therapeutischer Einsatz von VEGF

VEGF spielt eine Schlüsselrolle in der Knochenangiogenese und der enchondralen Knochenformation. Die Gabe von VEGF führt zu einer erhöhten Gefäßbildung und Ossifikation nach Knochenverletzungen (Street et al. 2002). Daher könnte die VEGF-Applikation bei der Revaskularisierung von nicht heilenden Frakturen hilfreich sein.

Hingegen führte die vorteilhafte Hemmung der pathologischen Angiogenese in verschiedenen Tumoren durch Inhibition von VEGF zur Entwicklung verschiedenster VEGF-Inhibitoren (Ferrara et al. 2003).

1.4.2 Bone morphogenetic protein

Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind multifunktionale Wachstumsfaktoren und gehören wie VEGF zur Gruppe der Zytokine. Ihre Funktion wurde von Urist 1965 entdeckt (Urist 1965), die verantwortlichen Proteine 1988 von Wozney beschrieben (Wozney et al. 1988).

Weiter sind sie Mitglieder der TGF- β -Superfamilie. Der TGF- β -Signalweg befindet sich nicht nur im Menschen, sondern auch in Taufliegen, im Zebrafisch, im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in vielen anderen Vielzellern. Studien im Mausmodell zeigten die Bedeutung der BMPs bei der Herz-, Neural- und Knorpelentwicklung (Chen et al. 2004). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der postnatalen Knochenentwicklung und nehmen Einfluss auf die Knochen- und Knorpelbildung, indem sie die Differenzierung und Proliferation von pluripotenten Mesenchymalzellen zu Osteo- und Chondroblasten fördern (Urist 1997).

Die Wirkung der BMPs ist dosisabhängig. Bei niedriger Dosierung nehmen sie Einfluss auf die Zellproliferation, bei höherer Dosierung auf die Zelldifferenzierung. Aufgebaut sind die dimeren Moleküle aus zwei über Disulfidbrücken verbundene Aminosäureketten. Zur Zeit sind mehr als 20 homo- und heterodimere morphogenetische Proteine bekannt, die aus 50 verschiedenen Genen synthetisiert werden können (Chen et al. 2012). Nicht alle beeinflussen die Osteogenese. Entsprechend ihrer Funktion und Proteinsequenz werden sie in vier Gruppen eingeteilt. BMP-2 und -4; BMP-5,-6,-7,-8a,-8b; BMP-9,-10 und BMP-12,-13,-14.

Die stärkste osteoinduktive Potenz haben das BMP-2,-4,-6 und -7 (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Sie werden von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen produziert. Gespeichert werden die BMPs nach ihrer Sekretion in der extrazellulären Matrix, aus der sie dann für das Knochenremodeling und die Knochenreparatur wieder abgegeben werden.

1.4.2.1 BMP Signalweg

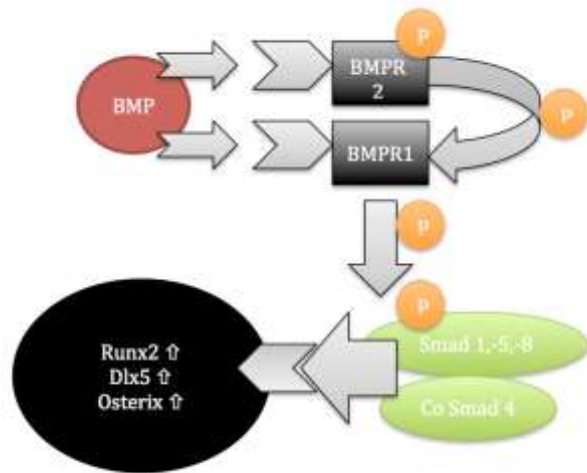


Abbildung 3: BMP Signalweg

BMP bindet an die Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren *bone morphogenetic protein receptor type 1* (BMPR1) und BMPR2 und löst ein Signal innerhalb der Zelle aus. Hierfür muss ein Typ I- und ein Typ II- Rezeptor einen heteromeren Komplex bilden, wodurch es zur Phosphorylierung des BMPR1 durch BMPR2 kommt.

BMPR1 kann nun *Sma and Mad related protein-1* (Smad-1), -5, und -8 innerhalb der Zelle phosphorylieren. Zusammen bilden sie mit *common mediator Smad-4* (Co-Smad-4) einen Proteinkomplex und aktivieren im Nukleus die Transkription der Gene von *runt-related transcription factor-2* (Runx2), *distal-less 5* (Dlx5) und Osterix (Chen et al. 2012).

Die Transkription kann durch kompetitive Hemmung der Bindungsstelle des Proteinkomplexes für aktivierende Smads durch *inhibitor Smads* verhindert werden.

1.4.2.2 Gewinnung von BMP

BMP wird im Körper nur in geringen Mengen in der Knochenmatrix gespeichert, daher muss es für therapeutische oder experimentelle Zwecke künstlich hergestellt werden. In der Vergangenheit wurde bovines BMP verwendet (Kato et al. 1993). Dies war jedoch mit hohen Kosten verbunden, da große Mengen Knochen demineralisiert werden mussten, um aus der verbleibenden Knochenmatrix BMP extrahieren zu können (Carreira et al. 2014).

Ende der 1980er-Jahre wurde das menschliche Gen für BMP sequenziert (Wozney et al. 1988). Damit war es in den nächsten Jahren möglich, BMP in großen Mengen von hohem pharmakologischem Reinheitsgrad kostengünstig zu synthetisieren.

Diese rekombinant hergestellten BMPs werden mit dem Präfix „rh“ für rekombinant human versehen. Biologisch aktive rh-BMPs werden durch verschiedene Organismen (*Escherichia coli*, *Picchia pastoris* und tierische Zellen = *chinese hamster ovary cells*) synthetisiert (Bustos-Valenzuela et al. 2011, Carreira et al. 2014, Colin et al. 2008).

1.4.2.3 Therapeutischer Einsatz von BMP

Der Nutzen von BMP bei der Frakturheilung ist bereits in präklinischen und klinischen Studien mit *Critical-size-defect*-Modellen evaluiert worden. Dabei handelt es sich um artifizielle Knochendefekte, die ohne Therapie nicht ausheilen können. In Tiermodellen mit Ratten, Hasen, Hunden, Schafen und Primaten konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Gabe von BMP die Ausheilung ermöglicht (Murakami et al. 2002). Erkenntnisse aus Mausmodellen suggerieren einen möglichen Nutzen bei der Behandlung der altersbedingten Osteoporose (Turgeman et al. 2002).

Klinische Studien, die sich mit der Effektivität von Frakturheilungen befassten, wiesen nach, dass die Verwendung von BMP Kosten und die Krankenhausaufenthaltszeit verringern kann (Alt et al. 2009). Es sind aber auch unerwünschte Wirkungen wie Schwellungen und die Entstehung von Seromen bei der Verwendung von Konzentrationen ab 1-3 mg/ml beschrieben (Leknes et al. 2008). Die Gabe sehr hoher BMP-Konzentrationen durch das Einbringen von Knochenersatzmaterial mit einer Dosis von 40 mg rh-BMP-2 zur Wirbelsäulenversteifung deutete in klinischen Studien auf ein erhöhtes Krebsrisiko hin. Allerdings gibt es bisher keinen eindeutigen Nachweis für diese Annahme (DeVine et al. 2012).

1.5 Trägermaterialien für Wachstumsfaktoren

In der Literatur sind unterschiedlichste Trägermaterialien (*carrier*) zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren beschrieben. Ein ideales Trägermaterial sollte durch seine mechanische Stabilität in der Lage sein, dem Druck des umgebenden Gewebes standzuhalten. Es sollte zusätzlich anatomisch formbar sein, um größere Knochendefekte überbrücken zu können. Am Ort der Insertion ist es wünschenswert, dass der *carrier* in einem Maß resorbiert wird, wie das neue Zielgewebe nachwächst. Weiterhin sollte er keine Fremdkörperreaktion auslösen und die Abgabe des reversibel gebundenen Wachstumsfaktors mit konstanter Dosis über längere Zeiträume gewährleisten (Gruber et al. 2009).

Schliephake et al. beschichteten Titanoberflächen mit Oligonukleotid-verankertem VEGF-165, um die Auswirkung auf die Einheilung von Implantaten zu untersuchen. Die Studie zeigte, dass sich VEGF-165 effektiv auf der Titanoberfläche verankern ließ und angiogene Aktivität ausübte (Schliephake et al. 2012). Metalle als *carrier* haben jedoch den Nachteil, nicht biologisch abbaubar und schwierig in der Verarbeitung zu sein (Yang et al. 2001).

Das schnell resorbierbare und gut verarbeitbare Kollagen als natürliches Polymer ist ein häufig verwendeter *carrier*. Es ist biokompatibel und dient als Leitstruktur für Gewebe (Horisaka et al. 1994). Es findet bereits klinische Anwendung bei der Behandlung von nicht heilenden Tibiafrakturen, Wirbelsäulenversteifungen und periimplantären Augmentationen des maxillären Sinusbodens (Boyne et al. 1997, Dimar et al. 2006, Fujimura et al. 1995). Leider führt die fehlende Stabilität der Kollagencarrier bei mechanisch beanspruchten Defekten nicht zur Regeneration eines suffizienten Knochenvolumens (Cochran et al. 2000). Kollagen lässt sich nicht anatomisch formen und kann so die verloren gegangene anatomische Struktur nicht vorübergehend ersetzen (Gruber et al. 2009).

Träger aus dem synthetischen Polymer Polylaktid (PLA) werden bereits seit über 20 Jahren erfolgreich in der Chirurgie eingesetzt. PLA ist relativ hart, anatomisch formbar und kann dem Gewebedruck im Gegensatz zum Kollagen standhalten. Es stellt je nach Herstellungsverfahren eine mehr oder weniger porige Struktur zur Verfügung, welche sich in Versuchen hilfreich für die Geweberegeneration gezeigt hat. Die vergrößerte Oberfläche des *carriers* unterstützt die Zelladhäsion, die Neovaskularisation und die Diffusion von Stoffwechselprodukten der neu eingewachsenen Zellen innerhalb des Trägers (Cima et al. 1991). Durch Hydrolyse im Gewebe wird es erst zum natürlichen Molekül Milchsäure und in weiteren Stoffwechselschritten zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut (Yang et al. 2001).

Wegen seiner kontrollierten Degradation, konstanten Abgabe der gebundenen Wachstumsfaktoren über längere Zeiträume und der guten Biokompatibilität ist PLA ein weit verbreiteter *carrier*.

1.6 Zielsetzung

Bei unfall- oder tumorbedingtem Verlust von Kieferknochen wird heute in der Regel körpereigener Knochen verpflanzt (autologes Transplantat). Die Entnahme geht mit einer zusätzlichen operativen Belastung mit erhöhter Morbidität des Patienten einher.

Die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Knochenregeneration macht es möglich, über eingebrachte Wachstumsfaktoren das Knochenwachstum zu stimulieren.

Die von uns verwendeten Wachstumsfaktoren sind bereits in mehreren Projekten untersucht worden. Meist wurden die Träger durch Auftropfen mit dem Wachstumsfaktor beladen. Dabei hat sich gezeigt, dass einerseits, je nach verwendeter Trägerart, meist die mechanische Stabilität des Trägers nicht ausreicht und andererseits die Abgabekinetik des Wachstumsfaktors zu unkontrolliert abläuft. Über 80% des Wachstumsfaktors wurden in den ersten 48 Stunden abgegeben (Gruber et al. 2009).

Im Vorfeld ist die kontinuierliche Abgabe von BMP-2 *in vitro* und *in vivo* aus Polylaktid mit inkorporiertem Wachstumsfaktor gezeigt worden (Gruber et al. 2009, Schliephake et al. 2007). Problematisch war die Resorption des *de novo* gebildeten Knochens bei niedrigen Dosierungen von 800 µg BMP-2/g Polymer. Es wurde vermutet, dass der Rückgang des gebildeten Knochens durch saure Abbauprodukte der Milchsäurepolymere infolge der Degradation hervorgerufen wird (Schliephake et al. 2008).

Diese Arbeit ist Teil einer größeren Untersuchung zur Knochenregeneration und befasst sich mit dem vaskulären Anteil. Sie hat das Ziel, Strategien zu entwickeln, die sowohl die Qualität der Trägermaterialien im Hinblick auf ihr Abbauverhalten verbessern als auch die Qualität des induzierten Knochens.

Im Unterschied zu den Vorversuchen wurde den Polylaktidimplantaten Kalziumkarbonat hinzugefügt, um eine Pufferung der sauren Degradationsprodukte zu erreichen (Weihe et al. 2004).

Zusätzlich wurde der Einfluss von VEGF auf die Knochenneubildung und dessen Erhalt betrachtet, da die Langzeitstabilität auch auf den Unterhalt von Gefäßen angewiesen ist.

Weiter ist von Interesse, ob durch die Kombination von BMP und VEGF Wechselwirkungen zwischen beiden Faktoren bestehen und so durch Erhöhung des einen Faktors bei gleichem Effekt der andere eingespart werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 207 männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) mit einem Durchschnittsgewicht von 425 Gramm der Firma Charles River Deutschland GmbH verwendet.

Sie wurden in Dreiergruppen in Makrolon-Standardkäfigen Typ 4 mit einer Lauffläche von 1815 cm² gehalten. Diese waren mit Lingucel® Select Einstreu der Firma L. Rettenmair ausgelegt. Einmal pro Woche wurde der Käfig gesäubert und neu eingestreut.

Die Umgebungstemperatur lag zwischen 20°C und 24°C mit einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Tiere waren einem 12 Stunden Tag-und-Nacht Rhythmus ausgesetzt.

Gefüttert wurden Standard-Ratten/Maus-Pellets 10 mm der Firma Ssniff und Leitungswasser nach Belieben.

2.2 Versuchsgenehmigung

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-10/0223 genehmigt.

2.3 Herstellung der Polylaktidimplantate

Das verwendete Trägermaterial waren Polylaktidimplantate aus Poly-D, L-Milchsäure mit einem Zusatz von Kalziumkarbonat.

Für die Beladung des Polylaktids mit Wachstumsfaktoren befanden sich diese in wässriger Lösung und wurden mit den Polylaktidgranula vermischt. Das Gemisch wurde lyophilisiert und bei -80 °C gelagert. Von diesen Granula mit beigemengtem Kalziumkarbonat kamen für jedes Implantat $0,06\text{ g}$ in Vertiefungen einer Poly-Tetra-Fluor-Ethylen-Platte (PTFE) (Abb.4) und wurden bei Raumtemperatur für 120 Minuten überkritischer Kohlendioxid Hochdruckbegasung von 100 Bar ausgesetzt. Hierdurch verflüssigt sich das Polymer.

Durch schnelles Ablassen des Überdrucks schäumt dies auf und füllt den Hohlraum der PTFE-Platten aus. Der Wachstumsfaktor befindet sich nun im Polymer und wird bei der späteren *in vivo* Degradation des Trägers langsam freigesetzt (Schliephake et al. 2007). Die Begasung der Implantate wurde an der Universität Duisburg-Essen, Institut für Anorganische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. M. Epple durchgeführt. Die endgültigen Implantate hatten einen Durchmesser von 7 mm und eine Dicke von 3 mm (Abb. 5).

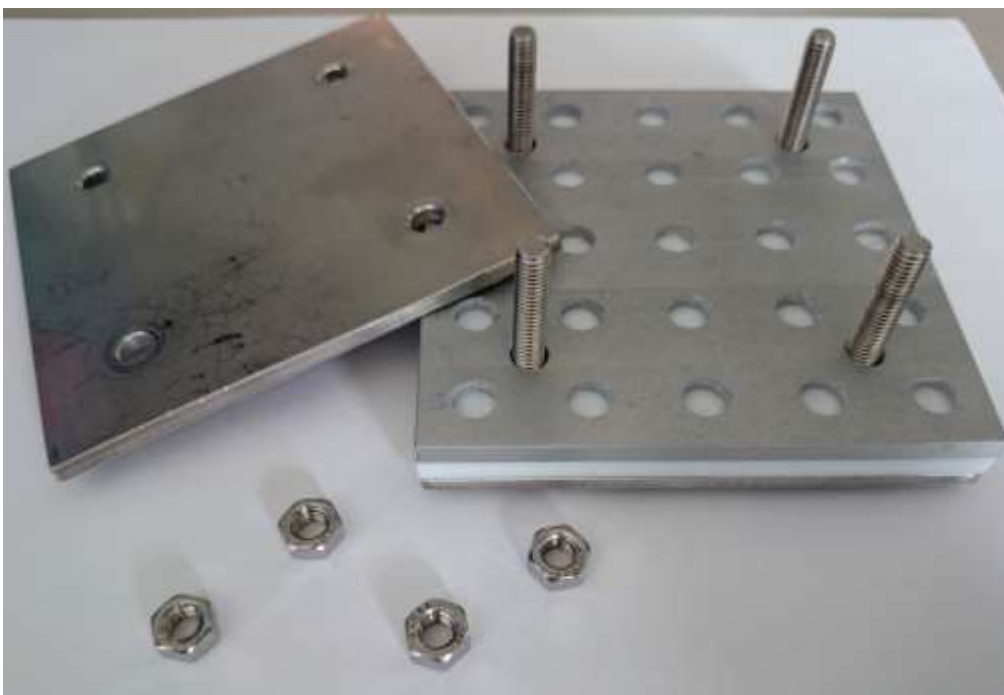


Abbildung 4: Poly-Tetra-Fluor-Ethylen-Platte



Abbildung 5: Implantate mit einem Durchmesser von 7 mm

Hergestellt wurden Implantate mit den folgenden Konzentrationen an Wachstumsfaktoren:

BMP

24 μg pro Implantat, 48 μg pro Implantat, 96 μg pro Implantat

VEGF

0,24 μg pro Implantat, 1,5 μg pro Implantat, 6 μg pro Implantat

Kombination

24 μg BMP + 1,5 μg VEGF, 24 μg BMP + 6 μg VEGF, 48 μg BMP + 1,5 μg VEGF,
48 μg BMP + 6 μg VEGF

In einer zweiten Gruppe wurden die Wachstumsfaktoren in den oben aufgeführten Dosierungen erst im Rahmen der chirurgischen Implantation aufgetropft.

Implantate ohne Wachstumsfaktor und Leerdefekte dienten als Kontrollen.

Die Implantate mit inkorporierten Wachstumsfaktoren und die Implantate ohne Wachstumsfaktor (=Kontrolle Blank) wurden den Ratten in die linke gluteale Muskulatur implantiert.

In den rechten Muskel wurden die Implantate mit aufgetropften Wachstumsfaktoren und für die Kontrolle Leerdefekte (=Kontrolle Leer) eingesetzt.

Untersucht wurden unterschiedlich lange Zeiträume (siehe Tab. 1).

Muskel links bzw. rechts, Wachstumsfaktor inkorporiert bzw. aufgetropft

Tabelle 1: Konzentrationen und Zeiträume

Dosis pro Implantat	4 Wochen	13 Wochen
BMP 24 µg	x	x
BMP 48 µg	x	x
BMP 96 µg	x	x
VEGF 0,25 µg	x	x
VEGF 1,5 µg	x	x
VEGF 6 µg	x	x
Kombination 24 µg BMP + 1,5 µg VEGF	x	x
Kombination 24 µg BMP + 6 µg VEGF	x	x
Kombination 48 µg BMP + 1,5 µg VEGF	x	x
Kombination 48 µg BMP + 6 µg VEGF	x	x
Kontrolle Blank	x	x

x= Untersuchter Zeitraum mit jeweils sechs Versuchstieren pro Gruppe

2.4 Operation

Die Narkose der Versuchstiere wurde durch Kohlenstoffdioxid eingeleitet und durch simultane Gabe von Medetomidin 60 µg/kg Körpergewicht und Ketamin 14 mg/kg Körpergewicht rechtsseitig intraperitoneal aufrechterhalten.

Nach Kontrolle der Narkosetiefe über einen interdigitalen Schmerzreiz wurden die Tiere auf eine Wärmematte gelegt und im Rückenbereich rasiert. In Bauchlage erfolgte die Inzision links ca. 1 cm lateral der Wirbelsäule. Nach Präparation einer Muskeltasche zur Aufnahme des Implantats wurde dieses gemäß Protokoll mit Wachstumsfaktorlösung betropft (Abb.6).

Die Markierung der Implantationsstelle erfolgte durch 4/0-Prolene als Muskelnäht. Der kutane Wundverschluss erfolgte mit 4/0-Vicryl.

Analoges Vorgehen auf der Gegenseite, jedoch Implantation des bereits vorbereiteten Implantats mit inkorporierter Wachstumsfaktorlösung. Für die Leerkontrolle wurde lediglich eine Muskeltasche präpariert, ohne eine Tablette zu implantieren und, wie bereits beschrieben, weiter verfahren.

Postoperativ erhielten die Tiere eine gewichtsadaptierte Gabe von Buprenorphin zur Analgesie, und die Anästhesie wurde durch die individuell adaptierte Gabe von Atipamezol antagonisiert.



Abbildung 6: eingelegtes Implantat in die präparierte Muskeltasche

2.5 Herstellung der Dünnschnitte

Die Entnahme der glutealen Muskulatur erfolgte zu den festgelegten Zeitpunkten gemäß Protokoll (siehe Tabelle 1). Nach der Entnahme wurden die Präparate direkt für 7 Tage in 4 % neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Es schloss sich eine Dehydratation mit aufsteigender Ethanolreihe bei Raumtemperatur an (zweimal 70% Ethanol für jeweils 24 Stunden, zweimal 96 % Ethanol für jeweils 24 Stunden). Als Intermedium wurde Xylol verwendet.

Die Einbettung erfolgte in drei Stufen mit dem Methylmethacrylat Technovit 9100® (Heraeus Kulzer, Wehrheim). Zum Auspolymerisieren kamen die Blöcke bei -8 °C für zwei bis drei Tage in einen Tiefkühlschrank.

Die Herstellung der Dünnschnitte mit einer Dicke von 5 µm erfolgte mit einem Rotations-Tischmikrotom unter Verwendung von 16-cm-Hartmetallmessern im D-Schliff. Die Schnittebene lag im größten Durchmesser des Implantats. Als Schneidflüssigkeit kam 40 % Ethanol zum Einsatz. Die Schnitte wurden auf Superfrost Ultra Plus® Adhäsions-Objektträger aufgezogen und mit Polyvinylchlorid-Folie abgedeckt und bei +50 °C getrocknet.

2.6 Immunfärbung

2.6.1 Antigendemaskierung

Für die Immunfärbung waren bei jedem Präparat zwei Schnitte notwendig. Es erfolgte für beide Färbungen zunächst eine Antigendemaskierung im Druckdampftopf Pascal (DAKO S 2800) gemäß Protokoll (siehe Tab.2).

Tabelle 2: Antigendemaskierung

1. Vorbehandlung	Antigendemaskierung mit EDTA/Tween 20 bei pH 8 Inkubation 18 Stunden bei 60 °C
2. Waschen	3 x 3 Minuten mit TTBS-Puffer
3. Blocken der endogenen Peroxidase	DAKO-Peroxidase-Blocking-Reagent S2023
4. Inkubation	Reaktionszeit 17 Minuten
5. Waschen	3 x 3 Minuten mit TTBS-Puffer
6. Blockieren mit Schweineserum	DAKO-Schweineserum (Normal) DAKO X0901, 10 % + 0,3 % Triton x, Roth Art. Nr. 3051.3, 200 µl pro Schnitt, Reaktionszeit 60 Minuten
7. ISO- Kontrolle CD31	Negativkontrolle mit Kaninchen-IgG (Normal) DAKO X0936 Konzentration 15 g/l

2.6.2 Färbung der Schnitte

2.6.2.1 CD31

Bei der Immunfärbung für das Oberflächenprotein-CD31 wurde zuerst der polyklonale-Kaninchen-Antikörper-Anti-CD31 (Abbiotec 250590) in verdünnter Lösung (5 µg/ml) appliziert und bei 4 °C über Nacht inkubiert (siehe Tab. 3). Folgend wurden die Schnitte mit TTBS-Puffer gewaschen und dann mit dem Schweine-Anti-Kaninchen-Immunglobulin (DAKO P0217) für 60 Minuten inkubiert.

Tabelle 3: Antikörperfärbung CD31

1. Antikörper	Polyklonaler-Kaninchen-Anti-CD31-Antikörper (Abbotec 250590) Verdünnung 1:200
2. Inkubation	4 °C über Nacht
3. Waschen	3 x 3 Minuten mit TTBS-Puffer
4. Antikörper	Schweine-Anti-Kaninchen-Immunglobulin DAKO P0217 Verdünnung 1:100
5. Inkubation	Reaktionszeit 60 Minuten

2.6.2.2 CD34

Zur Markierung des CD34-Oberflächenproteins kam der polyklonale-Kaninchen-Anti-CD34-Antikörper in der Verdünnung 6,7 µg/ml (Abbotec 250591) zum Einsatz (Tab. 4).

Die weiteren Schritte entsprechen der CD31-Färbung.

Tabelle 4: Antikörperfärbung CD34

1. Antikörper CD34	Polyklonaler-Kaninchen-Anti-CD34-Antikörper (Abbotec 250591) Verdünnung 1:150
2. Inkubation	4 °C über Nacht
3. Waschen	3 x 3 Minuten mit TTBS-Puffer
4. Antikörper	Schweine-Anti-Kaninchen-Immunglobulin DAKO P0217 Verdünnung 1:100
5. Inkubation	Reaktionszeit 60 Minuten

2.6.3 Substrat-Chromogensystem und Gegenfärbung

Das Diaminobenzidine-Chromogensystem (DAB) wurde sowohl bei den CD31-Präparaten als auch bei den CD34-Präparaten nach einer Waschung mit TTBS-Puffer appliziert. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Substrat-Chromogensystem und Gegenfärbung

1. Waschen	3 x 3 Minuten mit TTBS-Puffer
2. Substrat-Chromogensystem	DAB (pro 1 ml Substrat 1 Tropfen Liquid DAB Chromogen) Inkubation 3-5 Minuten unter Mikroskopkontrolle (6000 µl Substrat + 120 µl Chromogen)
3. Waschen	4 x 1 Minute <i>Aqua destillata</i> 1 x 5 Minuten <i>Aqua destillata</i>
4. Gegenfärbung	10 – 60 Sekunden Hämatoxylin (frisch filtriert), abspülen mit <i>Aqua destillata</i> , ca. 5 - 7 Minuten fließendes Leitungswasser
5. Dehydrieren, Eindecken	<i>Aqua destillata</i> , 2 x 70%, 96%, 3 x 100% (Ethanol), 3 x Xylol, Entellan

2.7 Mikroskopie

Mit Hilfe des Mikroskopierversystems-Olympus-Dotslide-2.1® (siehe Abb. 7) wurden die Objektträger mit 20-facher Vergrößerung gescannt und als digitale Bilder abgespeichert. Durch *Extended Focal Imaging* (EFI) werden auch außerhalb des eigentlichen Tiefenschärfebereichs des Objektivs liegende Strukturen scharf abgebildet. Dadurch konnten die Unebenheiten der Technovit® Dünnschnitte ausgeglichen werden. Die vom Dotslide System erzeugten Dateien wurden mit der Olympus-Cellsens-Dimensions-Software in unkomprimierte TIFF-Dateien mit einer Größe von ca. 4 Gigabyte umgewandelt.



Abbildung 7: Olympus Dotslide 2.1®

2.8 Auswertung

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS6. Dazu wurden sechs Messfelder mit einer Breite von 1634 Pixeln und einer Höhe von 2180 Pixeln gleichmäßig um den Rand des Implantats gelegt. Das Zentrum des Implantats beinhaltete ebenfalls ein Messfeld. Die Messfelder wurden so um das Implantat verteilt, dass sie etwa zur Hälfte im Implantat lagen und die andere Hälfte im Bereich des umliegenden Gewebes. Die ausgewählten Bereiche wurden als eigene Ebenen ausgeschnitten und nun ein Referenzwert für den braunen DAB-Farbstoff im Gesamtbild ausgewählt. Die Toleranz des Auswahlwerkzeuges lag bei 30. Ein Histogramm zeigt dann für das jeweilige Messfeld die Pixelanzahl der vorher festgelegten Referenzfarbe an. Dabei steht ein Pixel für die Fläche von

0,1 μm^2 . Die gemessenen Werte aller sieben Felder wurden in eine Tabelle übertragen und ein Mittelwert errechnet.

Überfärbte Bereiche mit Farbkümpfen oder anderen Artefakten wurden vor der Messung aus dem Bild ausgeschnitten.



Abbildung 8: Übersicht Präparat



Abbildung 9: Auswahl der Messfelder

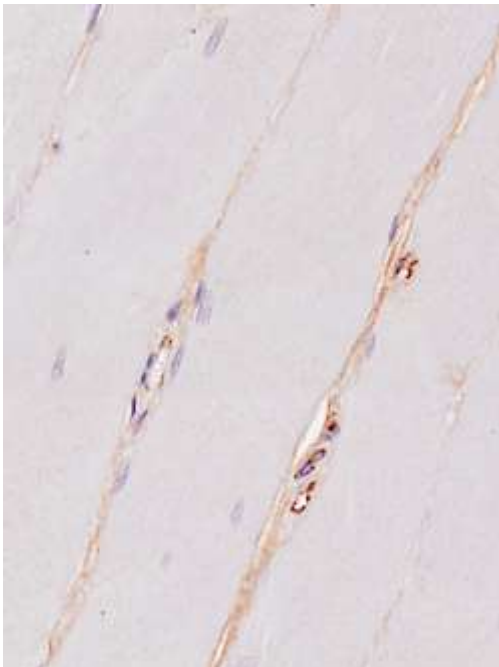


Abbildung 10: Referenzbereich

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte durch eine Varianzanalyse auf Mittelwertunterschieden mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Zur Korrektur der multiplen Testungen erfolgte eine Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm.

Die statistische Analyse der intraindividuellen Unterschiede erfolgte durch gepaarte t-Tests, wiederum auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

Die Analyse wurde mit dem Softwarepaket STATISTICA (StatSoft, Tulsa USA) in der Version 12 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 CD31-Antikörperfärbung

3.1.1 Wachstumsfaktor inkorporiert

3.1.1.1 VEGF

Bei der Betrachtung der histologischen Präparate mit inkorporiertem VEGF und CD31-Antikörperfärbung zeigte sowohl eine Erhöhung der VEGF-Konzentration (siehe Abb. 11) als auch die Verlängerung der Laufzeit einen sichtbaren Zuwachs an braun markierten Gefäßen in der Nähe der Implantate.

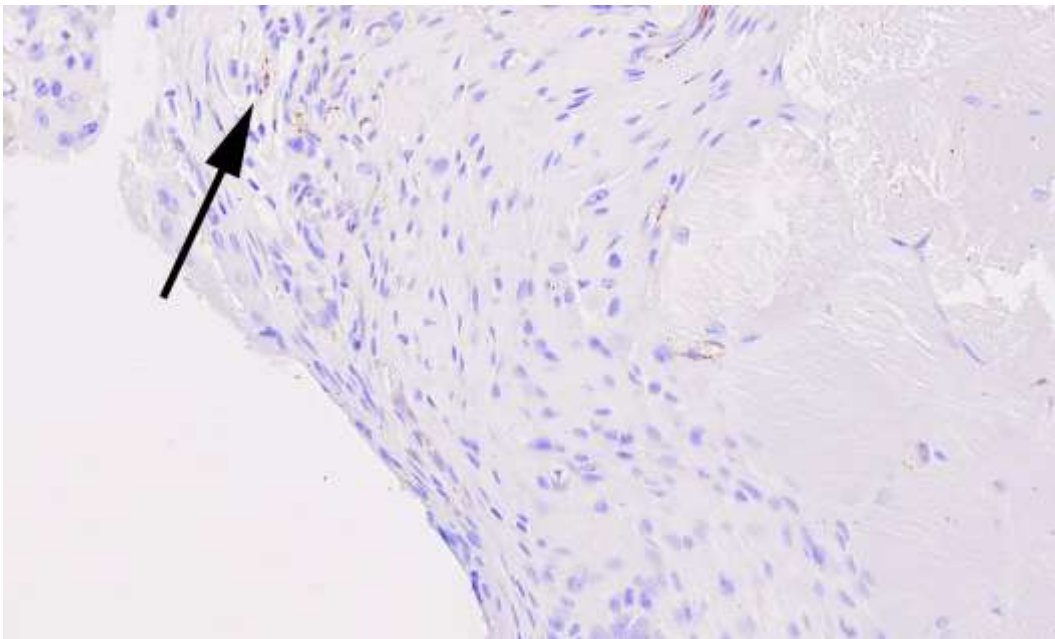


Abb. 11 a: 0,24 µg VEGF nach 4 Wochen

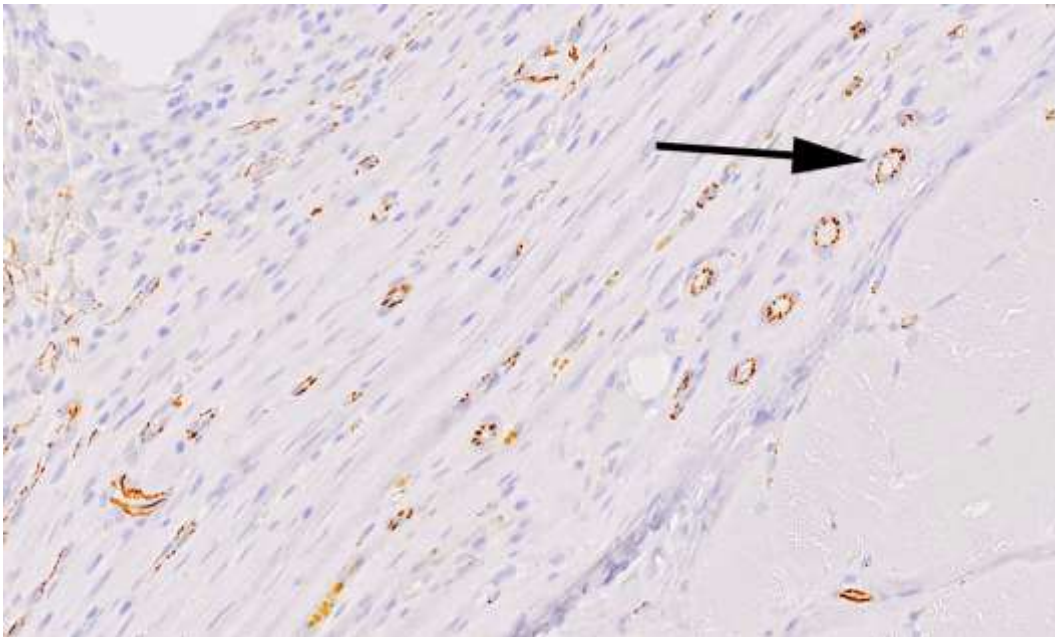


Abb. 11 b: 6 µg VEGF nach 4 Wochen

Abbildung 11 a; b: Beispielschnitte eines Auswertungsbereichs zur Darstellung der Unterschiede zwischen den Dosierungen nach 4 Wochen Laufzeit mit deutlicher Zunahme der braun markierten Gefäße (siehe Pfeil) bei 6 µg VEGF

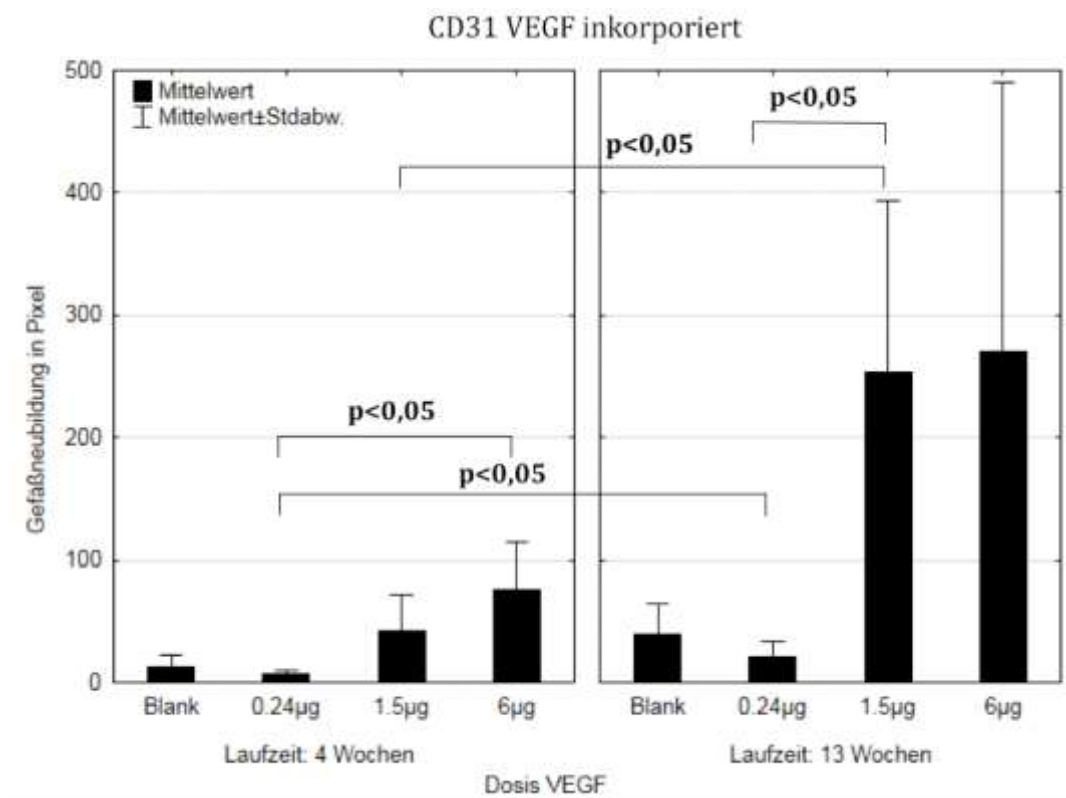


Abbildung 12: CD31 VEGF inkorporiert

Bei einer Dosierung von 0,24 µg VEGF zeigte sich nach 4 Wochen eine Gefäßneubildung von 7 Pixel und nach 13 Wochen von 22 Pixel. Die Konzentration von 1,5 µg VEGF erreichte Werte von 42 Pixel nach 4 Wochen und 253 Pixel nach 13 Wochen. Bei der höchsten Dosierung von 6 µg VEGF lag die Neubildung nach 4 Wochen bei 76 Pixel und nach 13 Wochen bei 270 Pixel.

In der Kontrollgruppe mit Polylaktidträgern ohne Wachstumsfaktor zeigten sich nach 4 Wochen Werte von 13 Pixel und nach 13 Wochen von 40 Pixel (siehe Abb. 12).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Durch eine statistische Analyse innerhalb der 4-Wochen-Gruppe konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede innerhalb dieser Gruppe vorliegen ($p=0,001$). Die durchgeführten t-Tests zeigten, dass eine Dosierung von 6 µg VEGF im Vergleich zu 0,24 µg VEGF signifikant mehr Gefäßneubildung hervorruft ($p=0,007$).

Die restlichen Vergleiche waren nicht signifikant.

Laufzeit 13 Wochen

Die Varianzanalyse innerhalb der 13-Wochen-Gruppe fand ebenfalls signifikante Unterschiede ($p=0,000$).

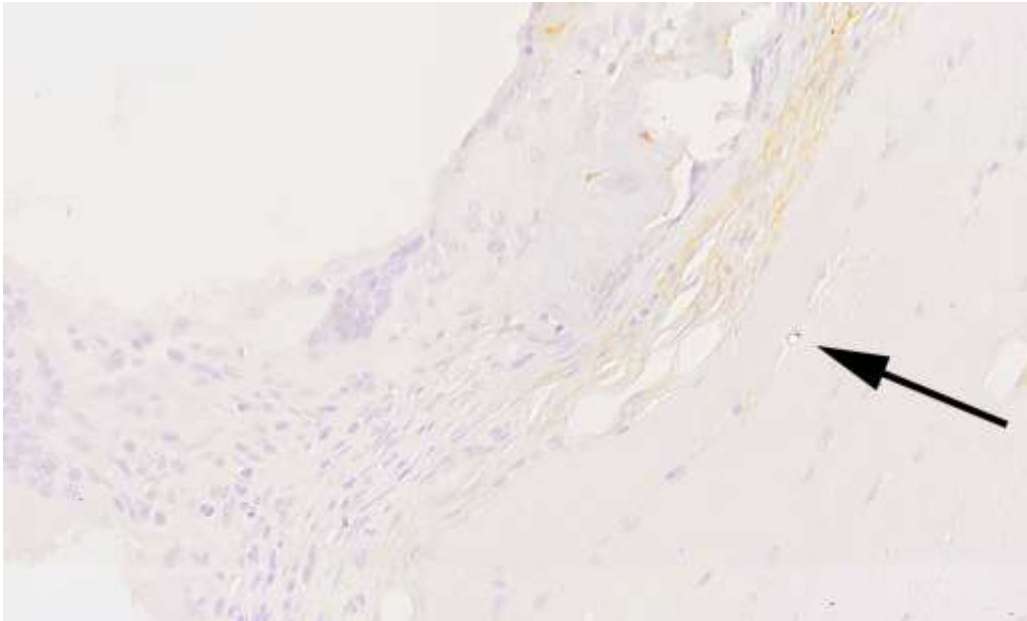
Die anschließenden t-Tests zeigten, dass die Gabe von 1,5 µg VEGF zu einer signifikant höheren Gefäßbildung führt als eine Dosierung von nur 0,24 µg VEGF ($p=0,010$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

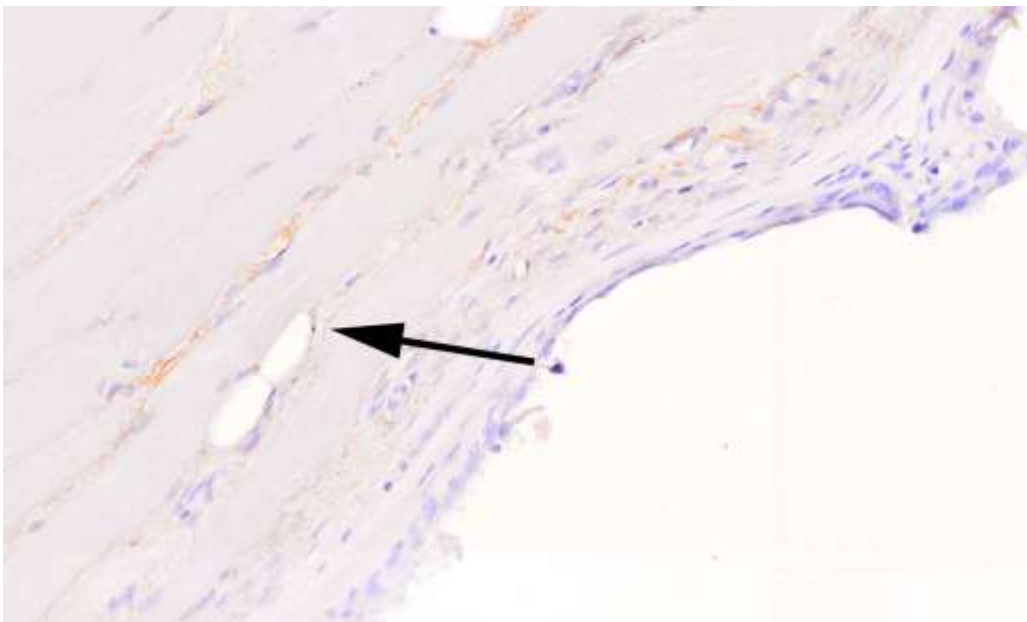
Der Vergleich der einzelnen Konzentrationen mittels t-Tests über die Laufzeiten von 4- und 13- Wochen zeigte, dass sowohl bei 0,24 µg VEGF ($p=0,028$) als auch bei 1,5 µg VEGF ($p=0,013$) nach 13 Wochen signifikant mehr Gefäße gebildet werden als nach 4 Wochen.

3.1.1.2 BMP

Im Vergleich der Implantationslaufzeiten von 4 Wochen und 13 Wochen zeigte nur die Dosierung von 24 μg inkorporiertem BMP nach 13 Wochen eine deutliche Zunahme an immunhistochemisch markierten Gefäßen (siehe Abb. 13). Eine Dosiserhöhung innerhalb der 4-Wochen- oder 13-Wochen-Gruppe führte nicht zu signifikant mehr Gefäßen bei einer der verwendeten Dosierungen.



24 μg BMP nach 4 Wochen



24 μg BMP nach 13 Wochen

Abbildung 13: Nach 4 Wochen keine braun markierten Gefäße im Präparat, dagegen nach 13 Wochen wenige braun markierte Gefäße (siehe Pfeile)

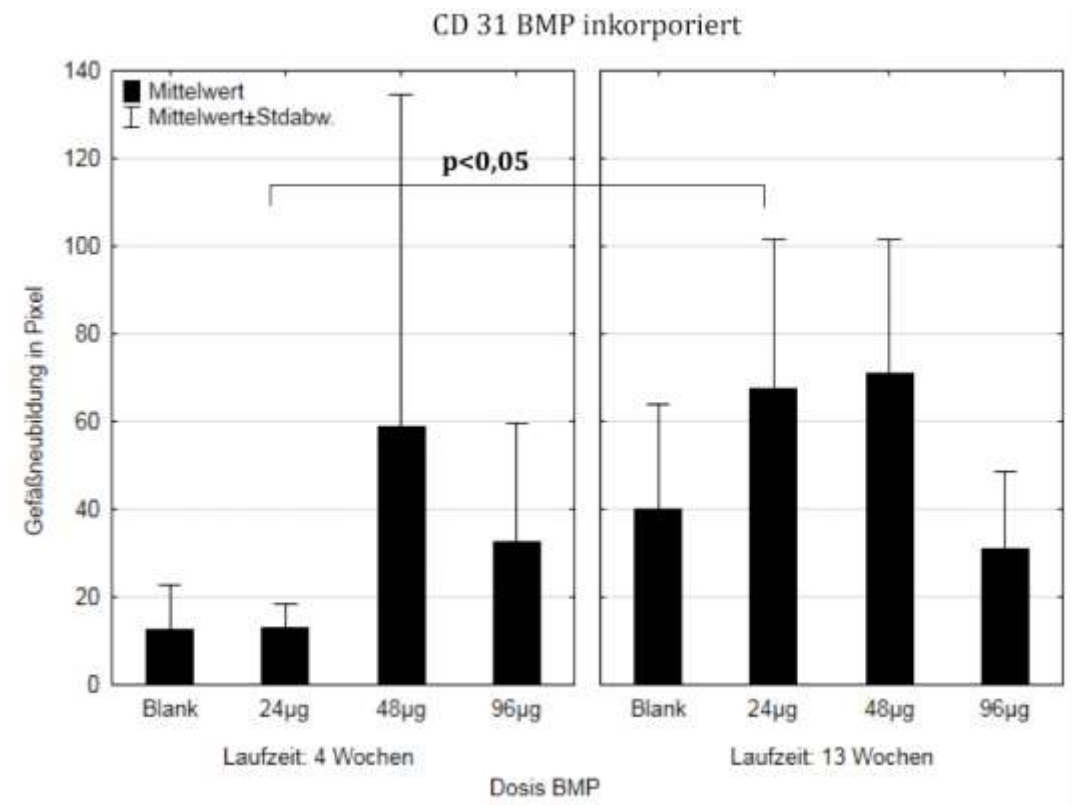


Abbildung 14: CD31 BMP inkorporiert

Die niedrige Dosierung 24 µg BMP lieferte nach 4 Wochen Ergebnisse von 13 Pixel und nach 13 Wochen von 69 Pixel.

Eine Konzentration von 48 µg BMP ergab nach 4 Wochen 59 Pixel und nach 13 Wochen 71 Pixel Gefäßneubildung. Die höchste Dosierung 96 µg BMP lieferte Werte von 33 Pixel nach 4 Wochen und 31 Pixel nach 13 Wochen Implantationsdauer (siehe Abb. 14).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die durchgeführte Varianzanalyse zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0,179$).

Laufzeit 13 Wochen

Innerhalb dieser Gruppe lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Dosierungen vor ($p=0,002$). Allerdings zeigten die post-hoc-Tests keine signifikanten Unterschiede.

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Bei einer Konzentration von 24 μg BMP lag nach 13 Wochen eine signifikant höhere Gefäßneubildung vor als nach 4 Wochen Implantationsdauer ($p=0,011$).

3.1.1.3 Kombination VEGF mit BMP

Die Untersuchung der Kombinationspräparate zeigte für alle verwendeten Dosierungen einen deutlichen Zuwachs an Gefäßen durch die Verlängerung der Implantationszeiträume (siehe Abb. 15). Innerhalb der 13-Wochen-Gruppe führte zudem die Kombination aus 6 μg VEGF und 48 μg BMP zu sichtbar mehr Gefäßen im histologischen Präparat als nur 1,5 μg VEGF mit 48 μg BMP (siehe Abb. 16).

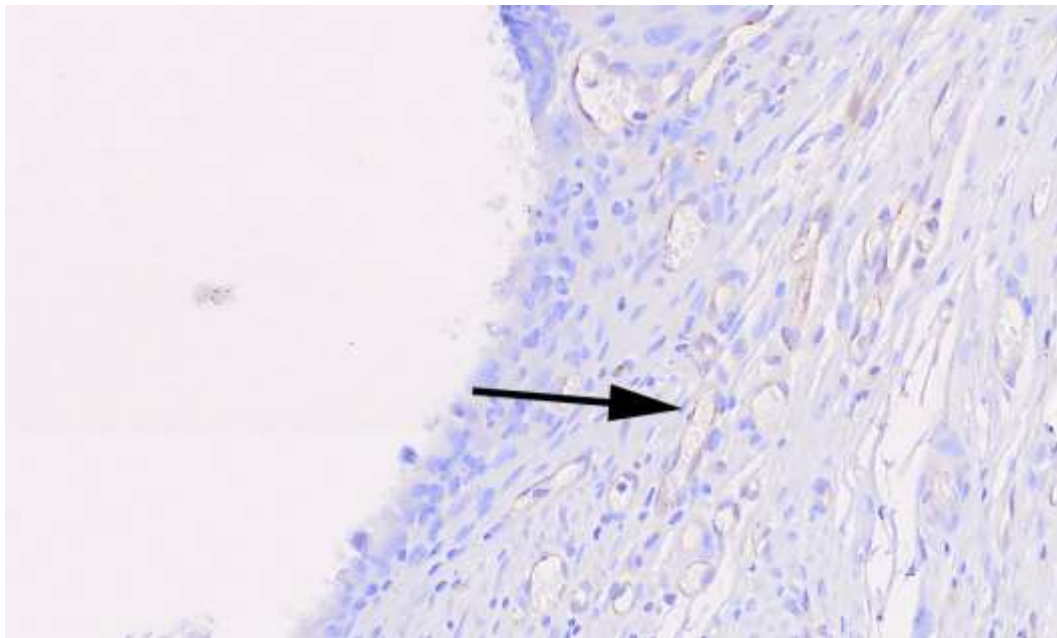


Abb. 15 a: 1,5 μg VEGF + 24 μg BMP nach 4 Wochen

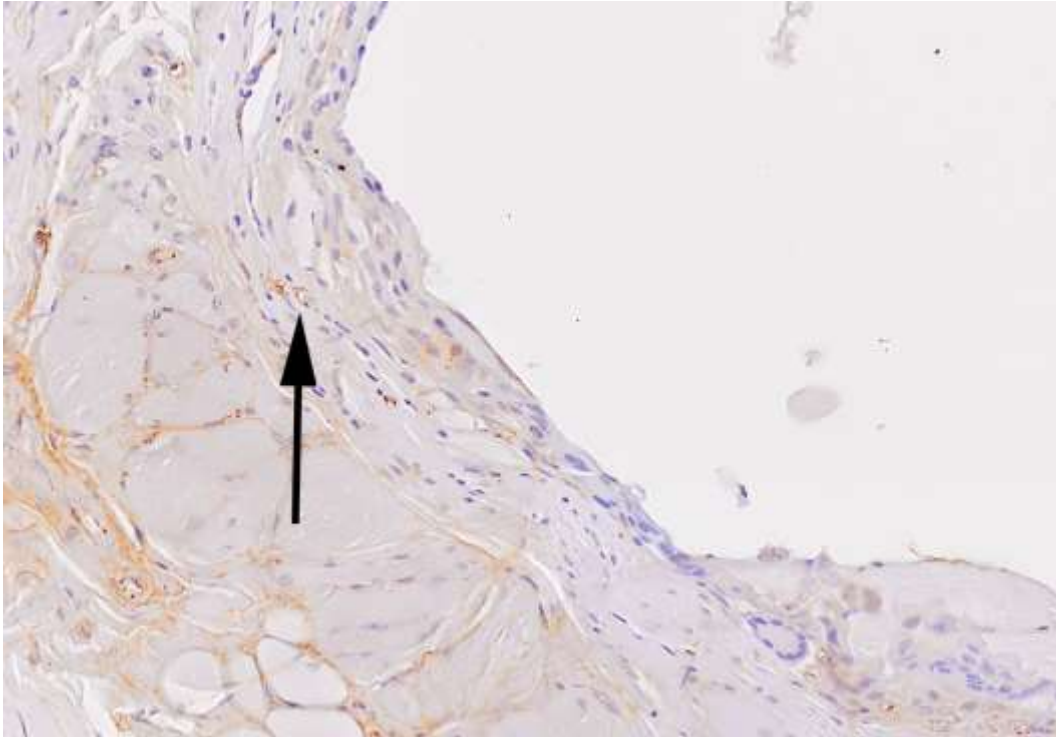


Abb. 15 b: 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP nach 13 Wochen

Abbildung 15 a; b: Deutlich sichtbare Zunahme an braun markierten Gefäßen (siehe Pfeile) nach 13 Wochen Laufzeit

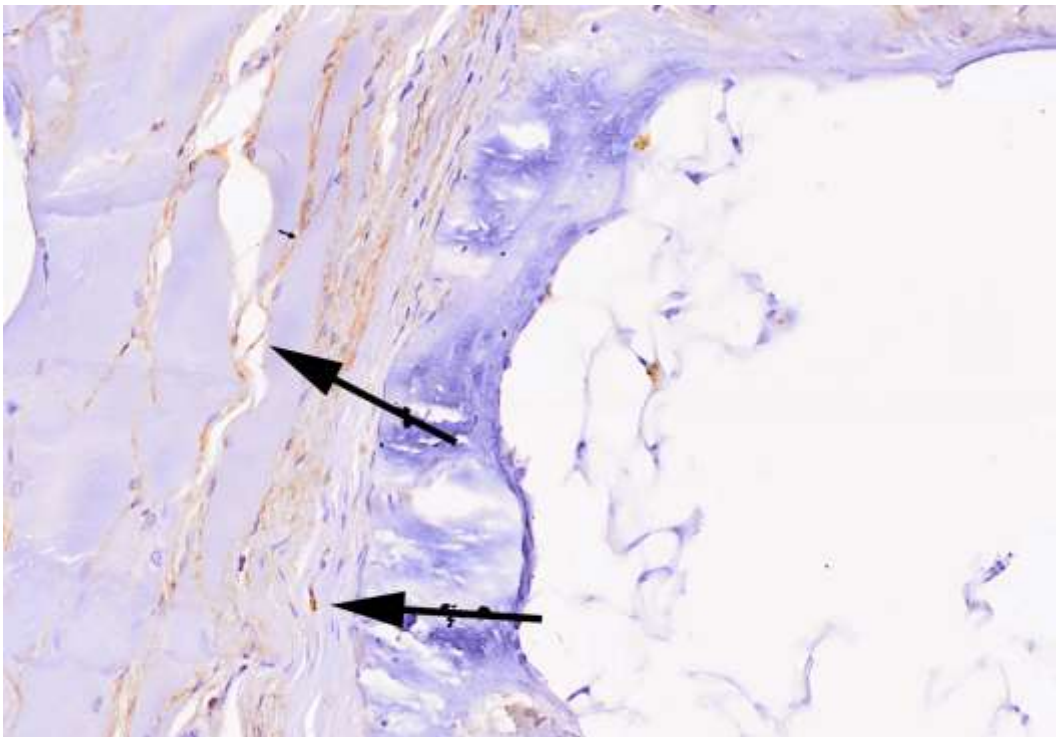


Abb. 16 a: 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP nach 13 Wochen

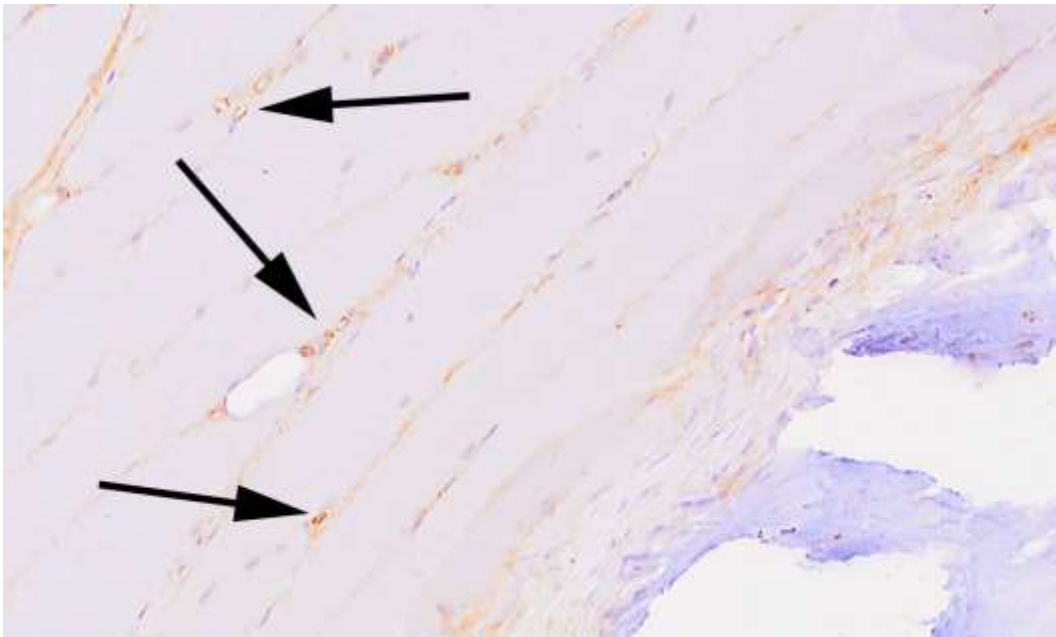


Abb. 16 b: 6 µg VEGF + 48 µg BMP nach 13 Wochen

Abbildung 16 a, b: Die histologischen Präparate zeigen eine deutliche Zunahme der Gefäße bei einer Erhöhung der VEGF-Konzentration von 1,5 µg VEGF auf 6 µg VEGF bei gleicher Dosierung von BMP mit 48 µg nach 13 Wochen Implantationsdauer

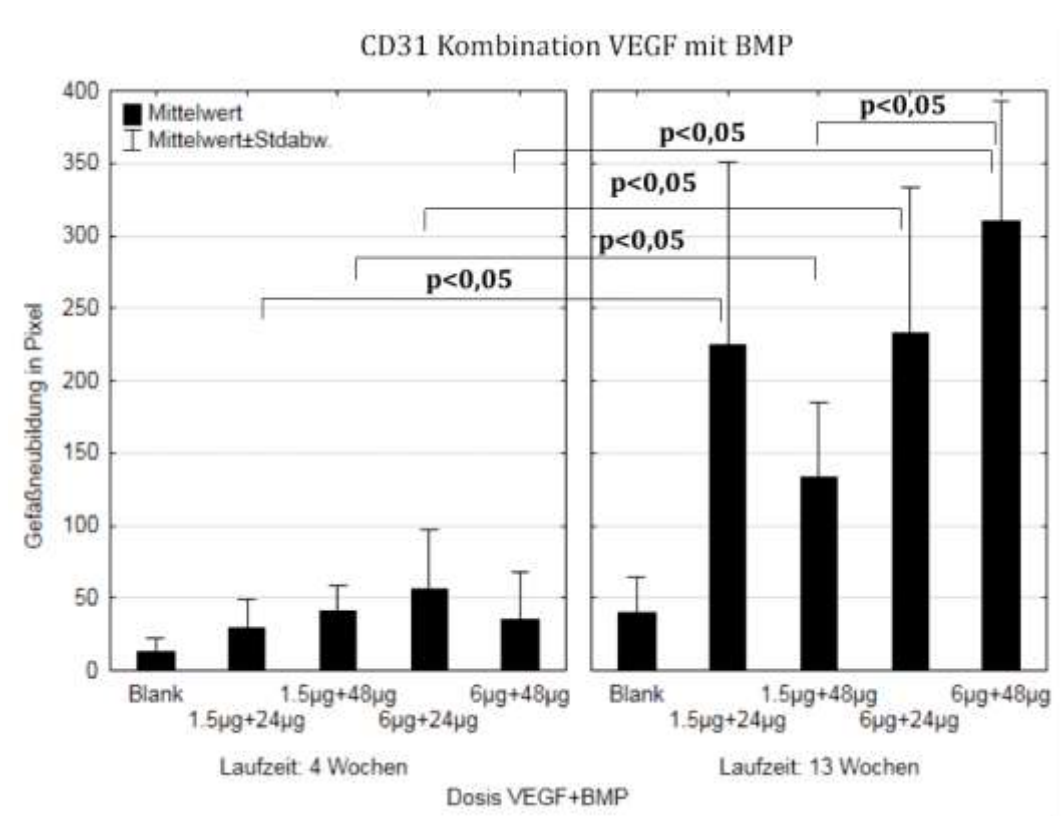


Abbildung 17: CD31 Kombination VEGF mit BMP

Eine Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP erzielte nach 4 Wochen Werte von 30 Pixel und nach 13 Wochen von 224 Pixel. Die Konzentration 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zeigte nach 4 Wochen 41 Pixel und nach 13 Wochen 133 Pixel Gefäßneubildung.

Die höchste VEGF-Dosierung von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP lag nach 4 Wochen bei 56 Pixel und nach 13 Wochen bei 232 Pixel. Die Kombination aus 6 µg VEGF mit 48 µg BMP ergab 35 Pixel nach 4 Wochen und 310 Pixel Gefäßzunahme nach 13 Wochen (siehe Abb.17).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die Analyse nach 4 Wochen stellte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosisgruppen dar ($p=0,337$).

Laufzeit 13 Wochen

Nach 13 Wochen fand die Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppen ($p=0,000$).

Die anschließenden t-Test zeigten, dass die Gefäßneubildung bei der Kombination aus 6 µg VEGF mit 48 µg BMP signifikant höher ist als bei einer Gabe von nur 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP ($p=0,002$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Der Vergleich der einzelnen Konzentrationen mittels t-Tests über die Laufzeiten von 4 und 13 Wochen ergab, dass bei allen Kombinationen eine Implantationszeit von 13 Wochen signifikant mehr Gefäßneubildung bewirkt. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP ($p=0,013$), 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP ($p=0,013$), 6 µg VEGF + 24 µg BMP ($p=0,006$) und 6 µg VEGF + 48 µg BMP ($p=0,000$).

3.1.1.4 Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen die alleinige Gabe von BMP und VEGF

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die Auswertung von 1,5 µg VEGF und 6 µg VEGF gegen 1,5 µg VEGF in Kombination mit 24 µg BMP zeigte nach 4 und 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede bei der Gefäßneubildung (4 Wochen $p=0,066$, 13 Wochen $p=0,896$).

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die Varianzanalyse fand sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen $p=0,106$, 13 Wochen $p=0,329$).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP

Die durchgeführten t-Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied nach 4 Wochen ($p=0,405$) und 13 Wochen Laufzeit ($p=0,740$).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP

Die durchgeführten t-Tests fanden erneut keine signifikanten Unterschiede nach 4 Wochen ($p=0,081$) und 13 Wochen Implantationsdauer der Polylaktidträger ($p=0,716$).

24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,254$).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,005$). Die anschließenden t-Tests mit Fehlerkorrektur nach Bonferroni ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede (24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP ($p=0,028$); 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP ($p=0,031$)).

24 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,235$).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,001$).

Die folgenden t-Tests zeigten eine signifikant höhere Gefäßbildung durch die Kombination aus 6 µg VEGF mit 24 µg BMP gegenüber 24 µg BMP ($p=0,008$) und 48 µg BMP ($p=0,009$) allein.

48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,656$).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,001$).

Die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zeigte signifikant höhere Werte als die alleinige Gabe von 96 µg BMP ($p=0,009$).

48 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,640$).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,000$).

Auch hier war die Kombination von VEGF mit BMP in beiden Fällen der Einzelgabe von BMP bei der Gefäßbildung signifikant überlegen. 48 µg BMP vs. 6 µg VEGF mit 48 µg BMP ($p=0,000$) und 6 µg VEGF mit 48 µg BMP vs. 96 µg BMP ($p=0,000$).

3.1.2 Wachstumsfaktor aufgetropft

3.1.2.1 VEGF

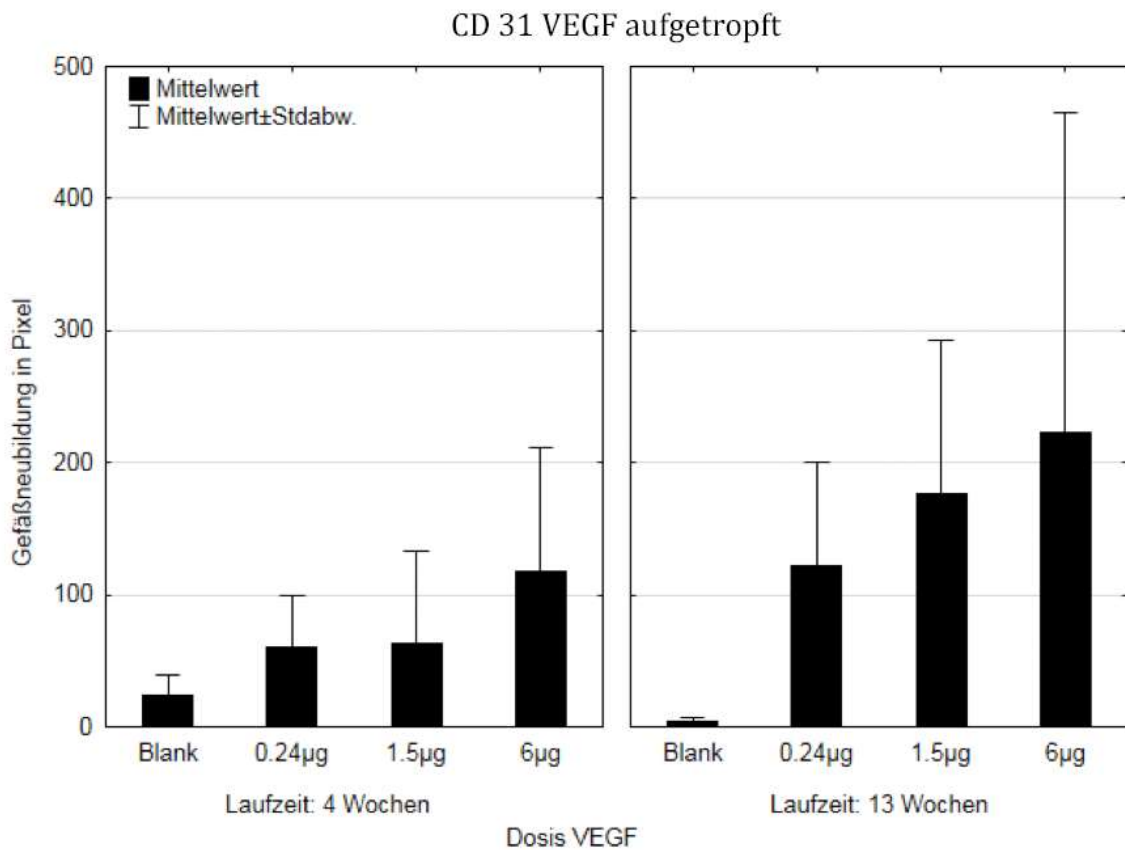


Abbildung 18: CD31 VEGF aufgetropft

In der Dosisgruppe 0,24 µg VEGF zeigte sich nach 4 Wochen eine Gefäßneubildung von 61 Pixel und nach 13 Wochen von 122 Pixel.

Bei einer Konzentration von 1,5 µg VEGF lag der Wert nach 4 Wochen bei 63 Pixel und nach 13 Woche bei 176 Pixel. Bei der höchsten Dosierung mit 6 µg VEGF lag der Wert nach 4 Wochen bei 118 Pixel und nach 13 Wochen bei 224 Pixel.

Die Kontrollgruppe mit reinen Leerdefekten lag nach 4 Wochen bei 24 Pixel und nach 13 Wochen bei 4 Pixel (siehe Abb.18).

Statistische Auswertung**Laufzeit 4 Wochen**

Die durchgeführte ANOVA fand in der 4-Wochen-Gruppe keine signifikanten Unterschiede ($p=0,153$).

Laufzeit 13 Wochen

Nach einer Laufzeit von 13 Wochen lag kein signifikanter Unterschied vor ($p=0,134$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Die statistische Analyse mittels t-Tests für den Vergleich von 4 Wochen und 13 Wochen Implantationsdauer zeigte keinen signifikanten Unterschied in den Therapiegruppen.

3.1.2.2 BMP

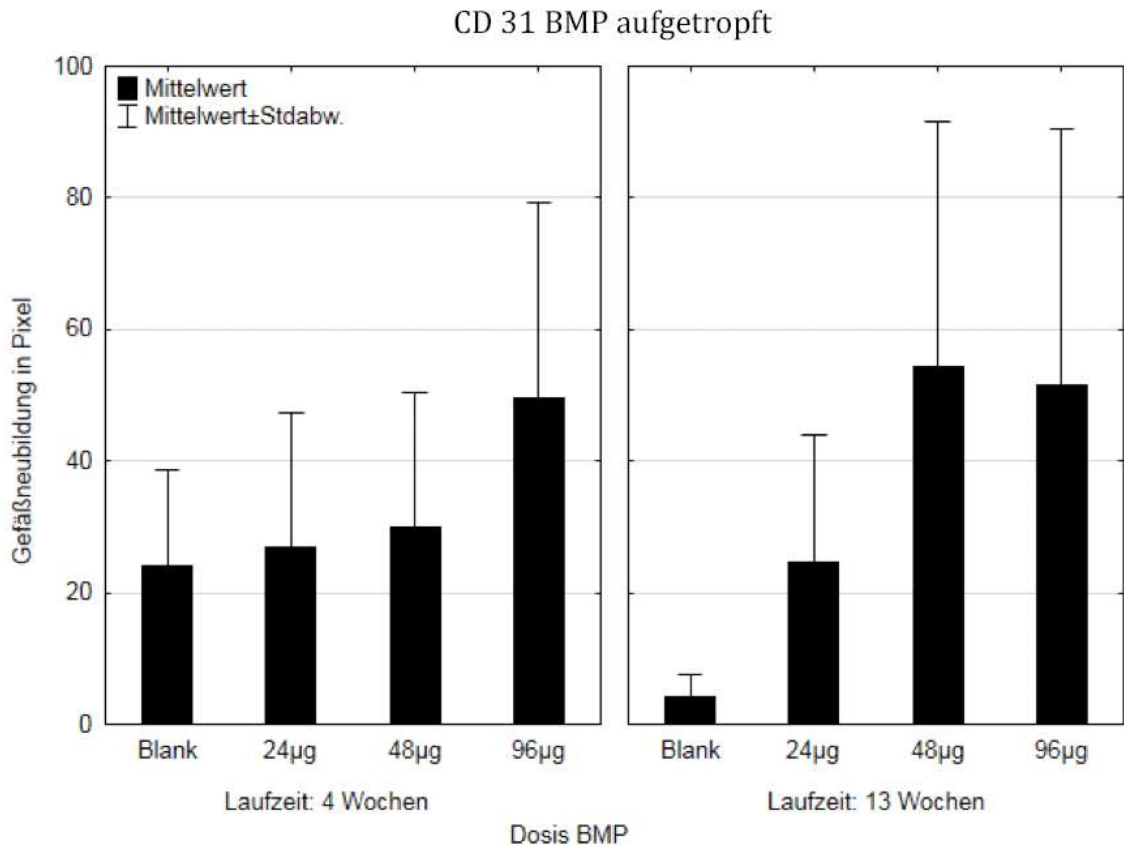


Abbildung 19: CD31 BMP aufgetropft

Die Gefäßneubildung bei einer Dosierung von 24 µg BMP lag nach 4 Wochen bei 27 Pixel und nach 13 Wochen bei 25 Pixel.

Die Verwendung von 48 µg BMP zeigte nach 4 Wochen einen Pixelwert von 30 und nach 13 Wochen einen Wert von 55 Pixel.

Die höchste Dosierung mit 96 µg BMP erzeugte Werte von 50 Pixel nach 4 Wochen und 52 Pixel nach 13 Wochen (siehe Abb. 19).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die durchgeführte Varianzanalyse zeigte bei dieser Laufzeit keine Signifikanzen auf ($p=0,234$).

Laufzeit 13 Wochen

Innerhalb dieser Gruppe lag in der ANOVA-Globalanalyse ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,032$), der sich in der nachfolgenden Subgruppenanalyse verlor.

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Bei keiner der verwendeten Konzentrationen führte eine längere Implantationsdauer zu einem signifikant besseren Ergebnis.

3.1.2.3 Kombination VEGF mit BMP

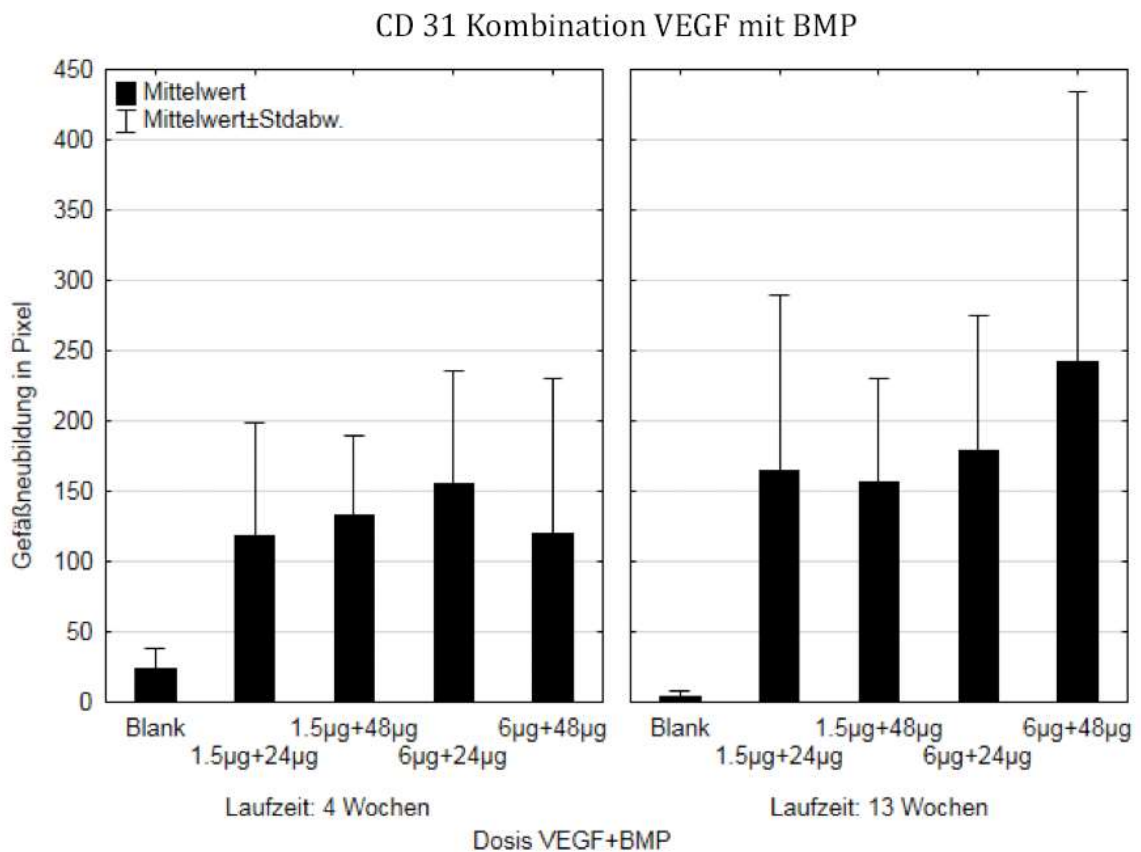


Abbildung 20: CD31 Kombination VEGF mit BMP

Die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP ergab nach 4 Wochen Werte von 119 Pixel und nach 13 Wochen von 164 Pixel. Die Gruppe mit 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zeigte nach 4 Wochen 133 Pixel und nach 13 Wochen 157 Pixel Gefäßneubildung.

Die höchste VEGF-Dosierung von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP lag nach 4 Wochen bei 155 Pixel und nach 13 Wochen bei 179 Pixel. Die Kombination aus 6 µg VEGF mit 48 µg BMP erzeugte 119 Pixel nach 4 Wochen und 242 Pixel Gefäßzunahme nach 13 Wochen Implantationsdauer der Träger (siehe Abb. 20).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die Analyse nach 4 Wochen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosisstufen ($p=0,087$).

Laufzeit 13 Wochen

Nach 13 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen vor.

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Bei keiner der verwendeten Konzentrationen führte eine längere Implantationsdauer zu einem signifikant besseren Ergebnis.

3.1.2.4 Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen VEGF und BMP allein

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die Kombination von 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP führte sowohl nach 4 Wochen als auch nach 13 Wochen nicht zu signifikant höheren Werten als 1,5 µg VEGF und 6 µg VEGF als Einzeldosis verabreicht (4 Wochen $p=0,475$, 13 Wochen $p=0,834$).

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die Kombination beider Wachstumsfaktoren war den Einzelpräparaten nicht signifikant überlegen (4 Wochen $p=0,307$, 13 Wochen $p=0,780$).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP

Die durchgeführten t-Tests ergaben keinen signifikanten Unterschied nach 4 und 13 Wochen Implantationszeit (4 Wochen $p=0,506$, 13 Wochen $p=0,699$).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede nach 4- und 13-Wochen Laufzeit (4 Wochen $p=0,981$, 13 Wochen $p=0,882$).

24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Nach 4 Wochen zeigte die ANOVA signifikante Unterschiede innerhalb der Dosierungen ($p=0,008$).

Aufgrund der immer durchgeführten Bonferroni-Korrektur mit daraus resultierender Anpassung des p-Werts konnten die anschließenden t-Tests dies nicht bestätigen (24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP $p=0,036$, 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP $p=0,040$).

Die statistische Analyse nach 13 Wochen zeigte signifikante Unterschiede innerhalb der Dosierungen auf ($p=0,016$). Die anschließenden t-Tests waren

jedoch annähernd nicht mehr signifikant (24µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP ($p=0,041$), 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP ($p=0,087$)).

24 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Nach der Laufzeit von 4 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,001$). Die Kombination von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP generierte gegenüber 24 µg BMP ($p=0,011$) und 48 µg BMP ($p=0,012$) als Einzelgabe signifikant mehr neue Gefäße (siehe Abb. 21).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen ($p=0,001$). Auch hier war die Kombination von VEGF mit BMP erneut überlegen (24 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP ($p=0,010$), 6 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP ($p=0,022$)).

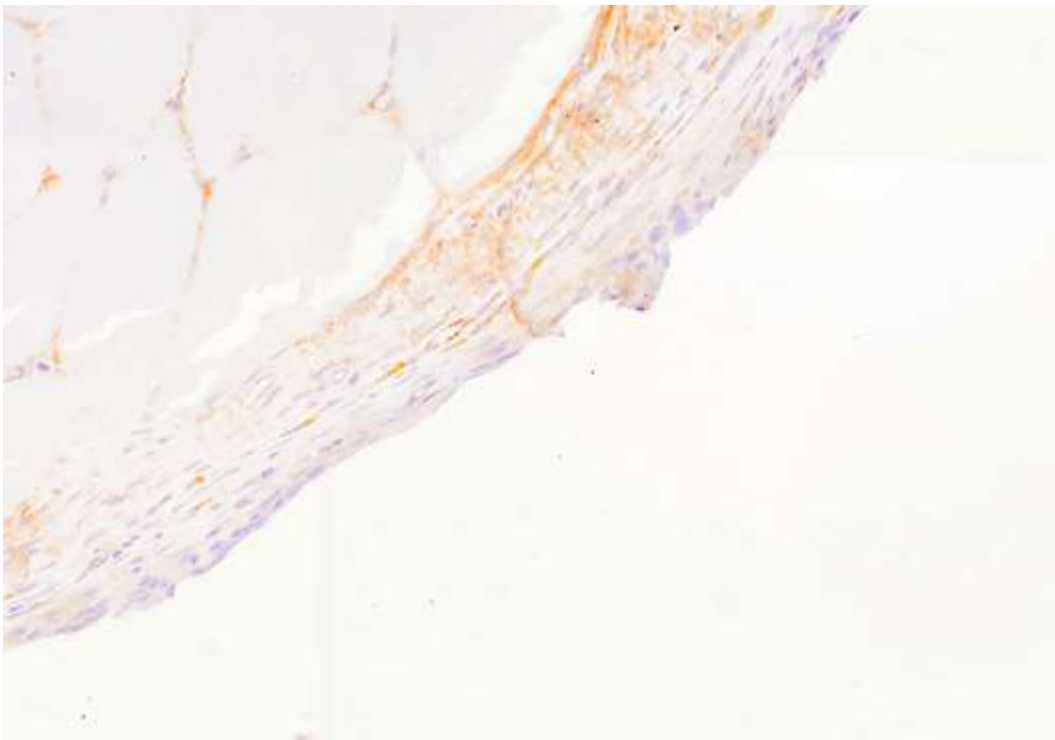


Abb. 21 a: 24 µg BMP nach 4 Wochen

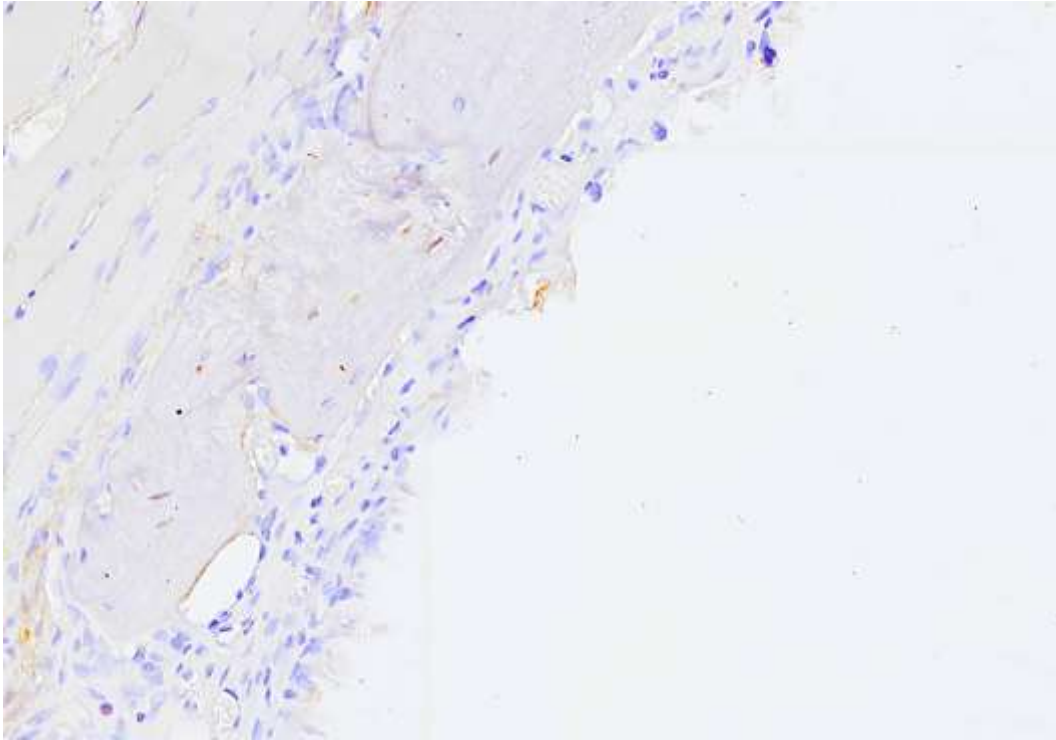


Abb.21 b: 48 μ g BMP nach 4 Wochen

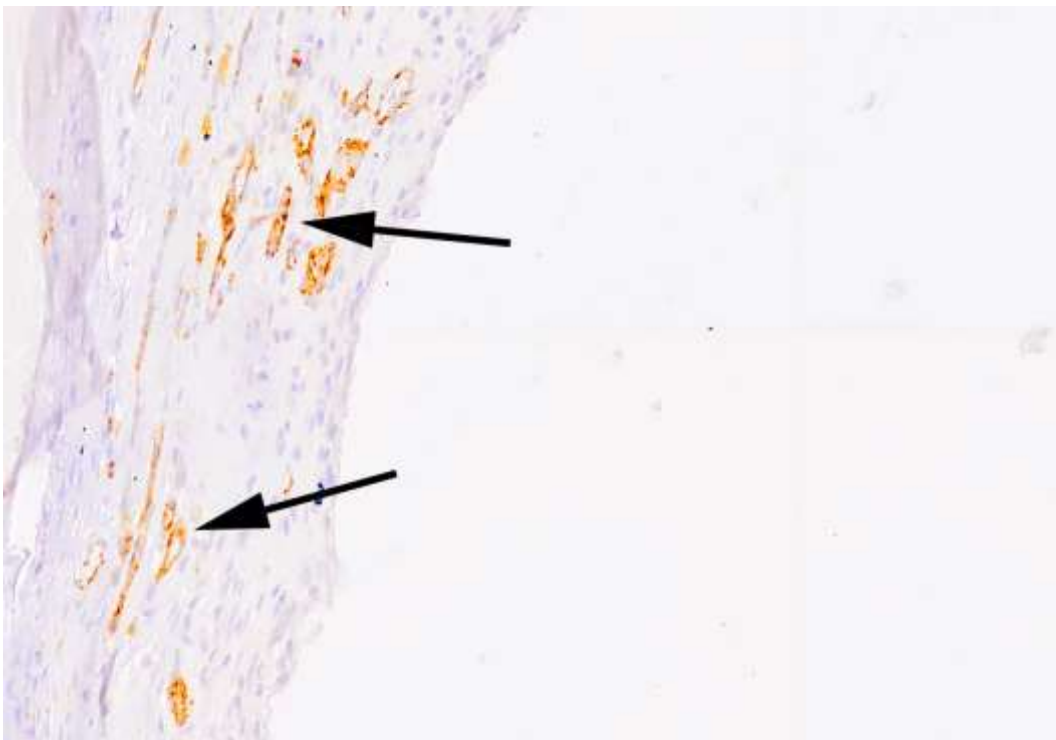


Abb. 21 c: 6 μ g VEGF + 24 μ g BMP nach 4 Wochen

Abbildungen 21 a; b; c: Beispielschnitte der Auswertungsbereiche zur Darstellung von Unterschieden zwischen den einzelnen Dosierungen mit einer deutlichen Zunahme an braun gefärbten Gefäßen bei der Kombination aus 6 μ g VEGF mit 24 μ g BMP im Vergleich zu 24 μ g BMP und 48 μ g BMP als Einzeldosis

48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Die statistische Analyse nach 4 Wochen zeigte, dass die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zu einem signifikant höheren Gefäßwachstum führt (48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP $p=0,005$; 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP ($p=0,014$)).

Nach 13 Wochen war die kombinierte Gabe der Wachstumsfaktoren der alleinigen Gabe von BMP signifikant überlegen (48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP ($p=0,018$), 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP ($p=0,017$)).

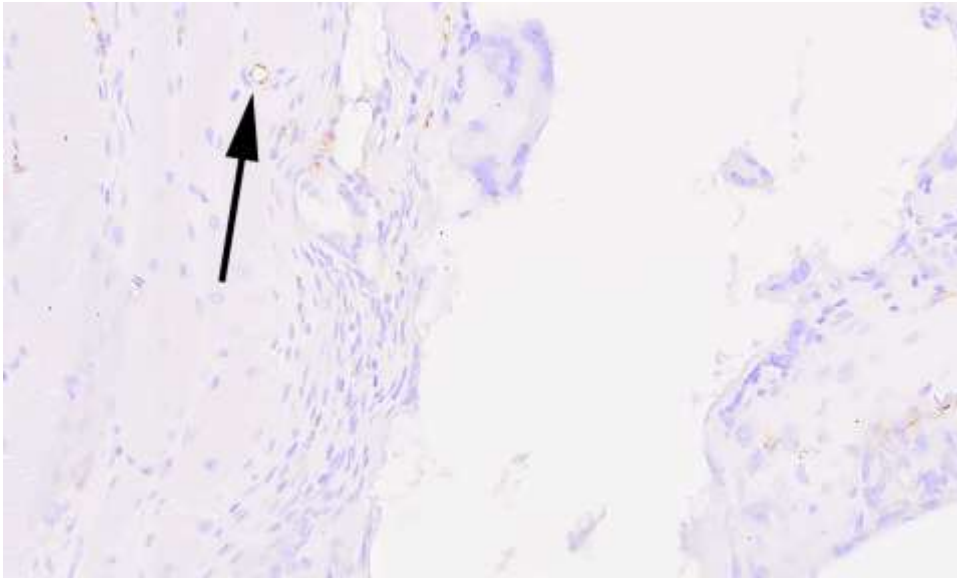
48 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,085$).

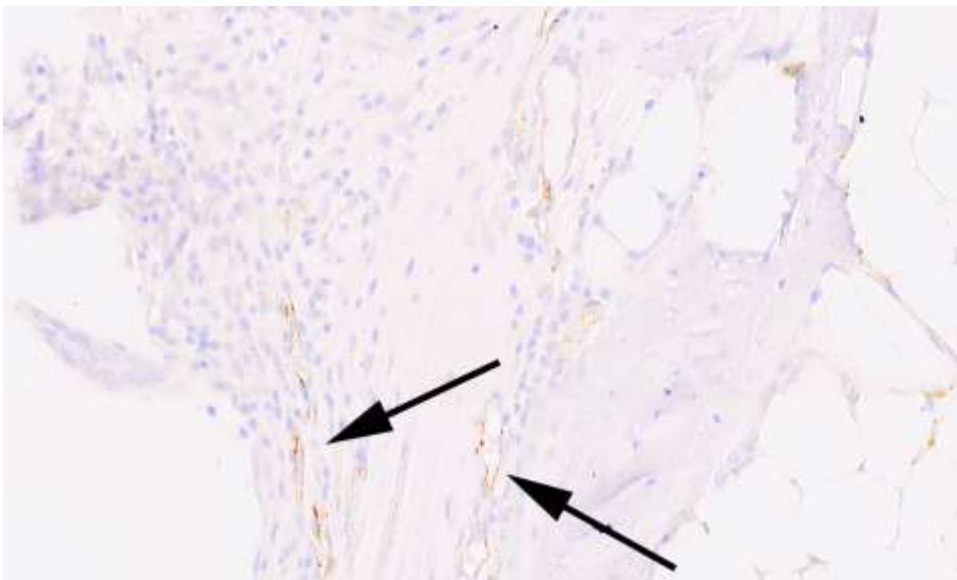
Die Varianzanalyse nach 13 Wochen deutete auf einen signifikanten Unterschied hin ($p=0,024$), lies sich aber mit den folgenden t-Tests nicht bestätigen (48 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP ($p=0,092$), 6 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP ($p=0,088$)).

3.1.3 Vergleich Wachstumsfaktor inkorporiert gegen Wachstumsfaktor aufgetropft.

Der Vergleich zwischen den Beladungsformen aufgetropft und inkorporiert führte mehrfach nach 4 Wochen Implantationsdauer zu signifikant höheren Werten bei den durch Aufgetropften beladenen Polylaktidträgern (siehe Abb. 22).



1,5 µg VEGF + 48 µg BMP nach 4 Wochen, Wachstumsfaktoren inkorporiert



1,5 µg VEGF + 48 µg BMP nach 4 Wochen, Wachstumsfaktoren aufgetropft

Abbildung 22: Bei den durch Aufgetropften beladenen Trägern zeigen sich nach 4 Wochen trotz gleicher Dosierung signifikant mehr braun gefärbte Gefäße (siehe Pfeile)

Nach 13 Wochen führte die Kontrollgruppe der Polylaktidträger ohne Wachstumsfaktor mit einem Wert von 40 Pixel zu einem signifikant höheren Ergebnis als die Leerkontrolle mit 4 Pixel ($p=0,024$).

Bei einer Konzentration von $0,24 \mu\text{g}$ VEGF lag die Gefäßneubildung nach 4 Wochen bei den Polylaktidträgern mit aufgetropftem Wachstumsfaktor mit 61 Pixel signifikant höher als bei den Trägern mit inkorporiertem VEGF mit nur 7 Pixel Gefäßzunahme ($p=0,024$).

Auch bei der Kombination von $1,5 \mu\text{g}$ VEGF mit $48 \mu\text{g}$ BMP und $6 \mu\text{g}$ VEGF mit $24 \mu\text{g}$ BMP waren die Pixelwerte nach 4 Wochen Implantationsdauer bei den Trägern mit aufgetropften Wachstumsfaktoren signifikant höher (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Vergleich inkorporiert gegen aufgetropft (signifikante Werte unterstrichen)

Dosis	4 Wochen Laufzeit p-Wert	13 Wochen Laufzeit p-Wert
Kontrolle (Blank +Leer)	0,255	<u>0,024</u>
24 μg BMP	0,178	0,062
48 μg BMP	0,266	0,209
96 μg BMP	0,091	0,431
0,24 μg VEGF	<u>0,024</u>	0,062
1,5 μg VEGF	0,336	0,610
6 μg VEGF	0,338	0,939
1,5 μg VEGF + 24 μg BMP	0,112	0,531
1,5 μg VEGF + 48 μg BMP	<u>0,015</u>	0,816
6 μg VEGF + 24 μg BMP	<u>0,028</u>	0,408
6 μg VEGF + 48 μg BMP	0,254	0,312

3.2 CD34-Antikörperfärbung

3.2.1 Wachstumsfaktor inkorporiert

3.2.1.1 VEGF

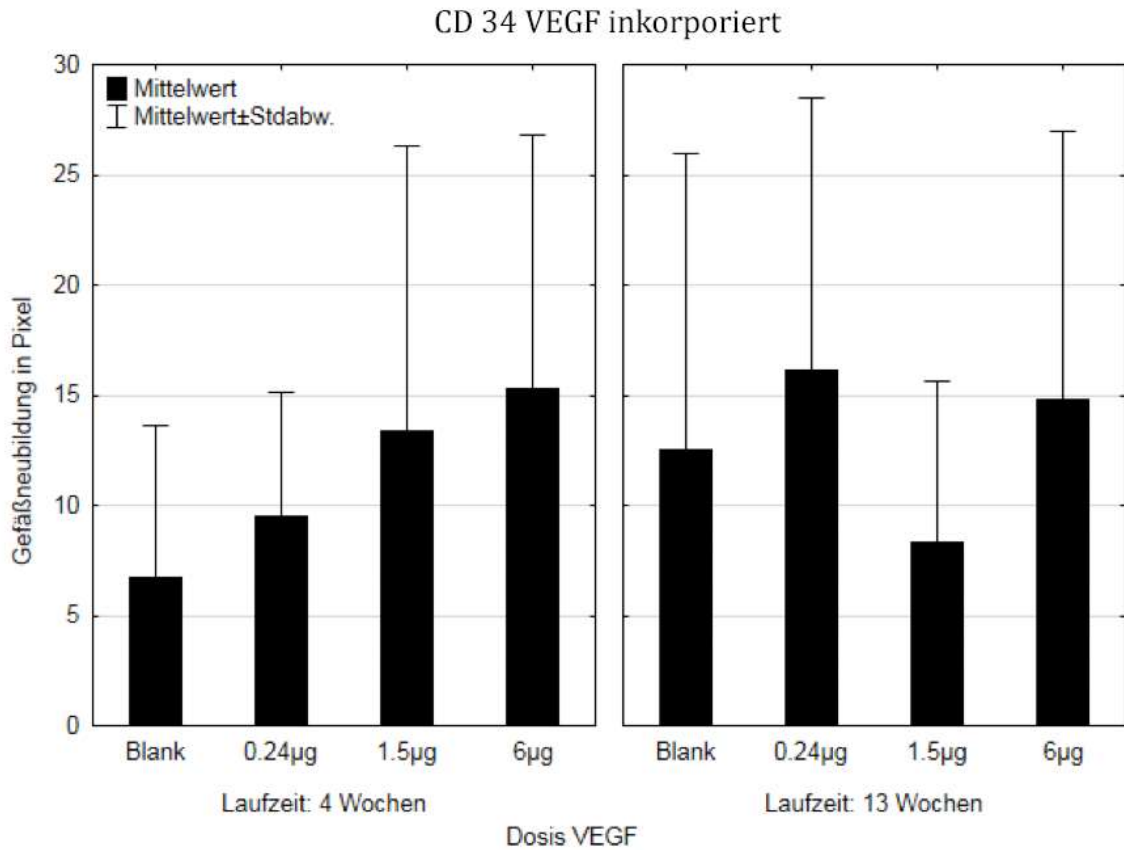


Abbildung 23: CD34 VEGF inkorporiert

Bei einer Dosierung 0,24 µg VEGF zeigte sich nach 4 Wochen eine Gefäßneubildung von 10 Pixel und nach 13 Wochen von 16 Pixel. Die Konzentration von 1,5 µg VEGF ergab Werte von 13 Pixel nach 4 Wochen und von 8 Pixel nach 13 Wochen Implantationsdauer. Durch die höchste Dosierung von 6 µg VEGF lag die Neubildung nach 4 Wochen bei 15 Pixel und nach 13 Wochen ebenfalls bei 15 Pixel. In der Kontrollgruppe (Blank) mit Polylaktidträgern ohne Wachstumsfaktor zeigten sich nach 4 Wochen Werte von 7 Pixel und nach 13 Wochen von 13 Pixel (siehe Abb. 23).

Statistische Auswertung**Laufzeit 4 Wochen**

Die durchgeführte Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied auf ($p=0,490$).

Laufzeit 13 Wochen

Die durchgeführte Varianzanalyse fand keinen signifikanten Unterschied für die verschiedenen Konzentrationen ($p=0,733$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Die durchgeführten t-Tests zeigten für keine der verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Vorteil bei einer längeren Implantationsdauer von 13 Wochen.

3.2.1.2 BMP

Die histologische Auswertung für inkorporiertes BMP zeigte eine deutliche Zunahme der positiv gefärbten Areale bei einer Verlängerung der Implantationszeit für alle von uns verwendeten BMP-Dosierungen (siehe Abb. 24).

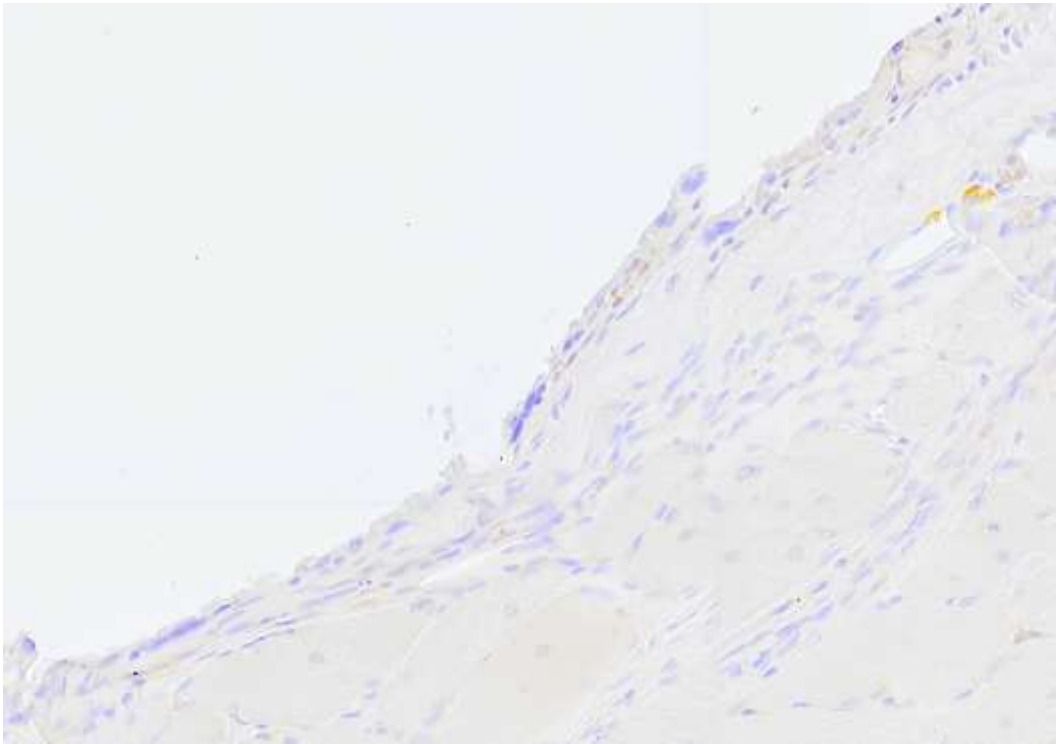


Abb. 24 a: 48 µg BMP nach 4 Wochen

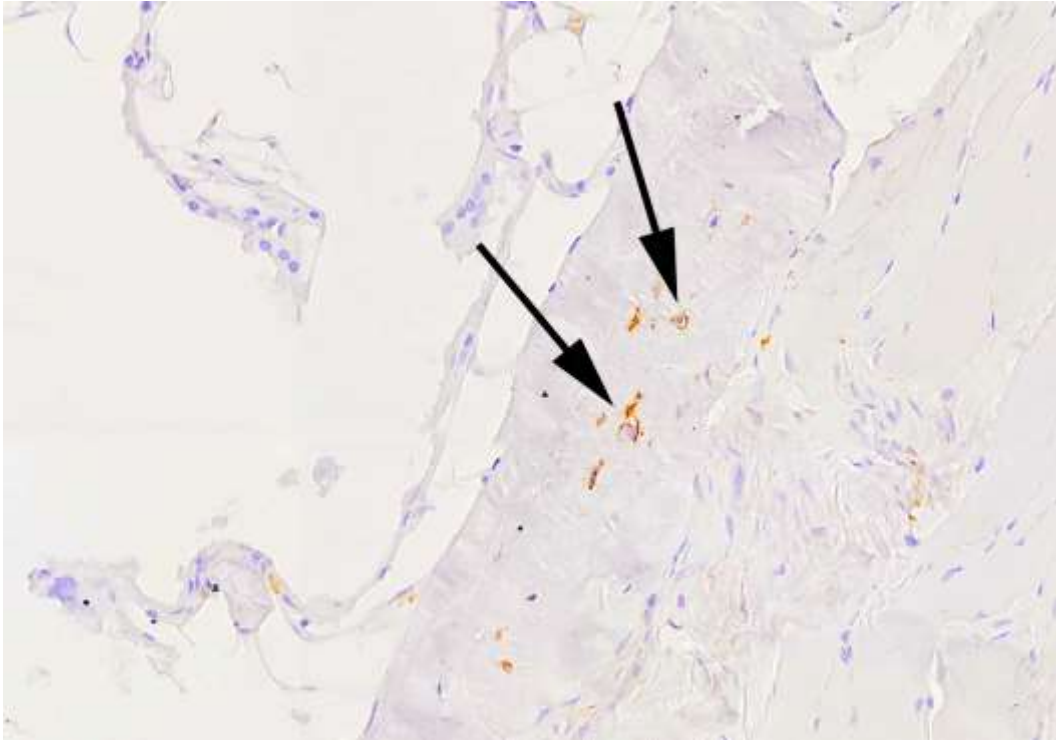


Abb. 24 b: 48 µg BMP nach 13 Wochen

Abbildungen 24 a; b: Histologische Beispielschnitte ohne positiv markierte Bereiche bei 48 µg BMP nach 4 Wochen und vielen positiv markierten Gefäßen nach 13 Wochen Laufzeit innerhalb des neu gebildeten Knochens am Rand der Tablette (siehe Pfeile).

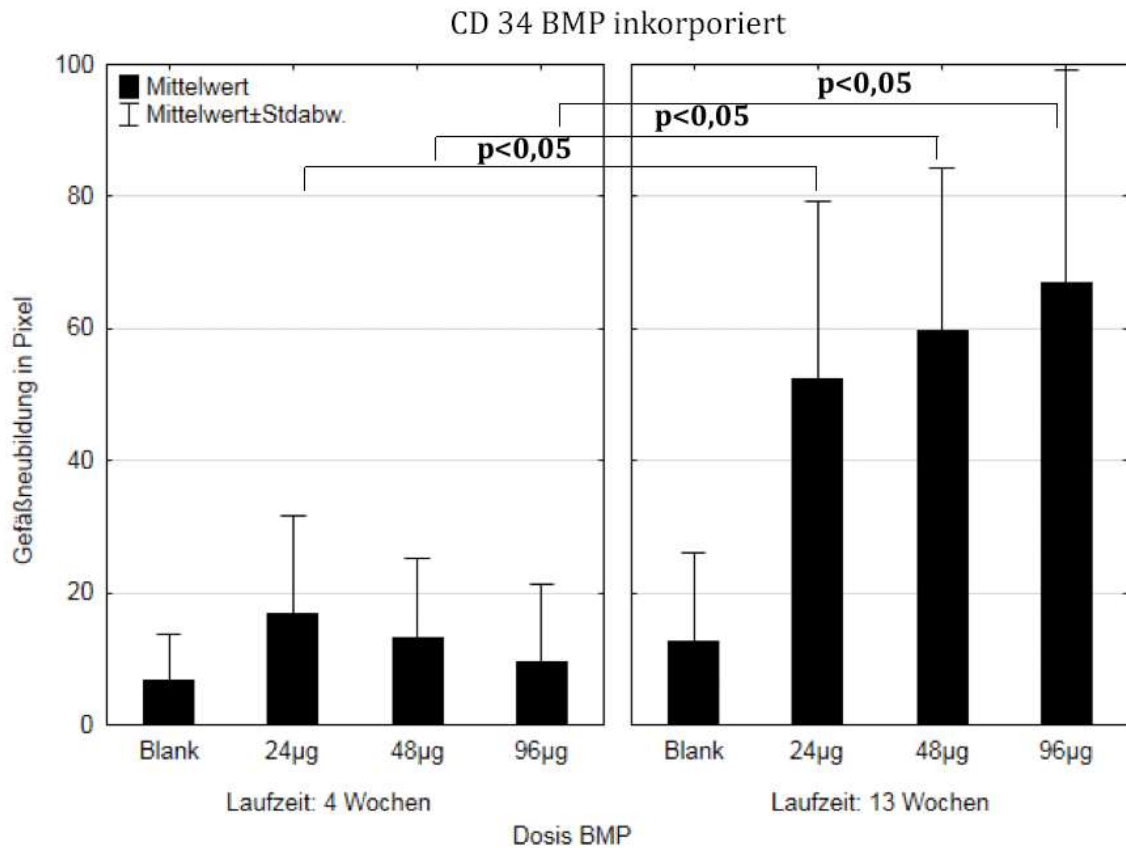


Abbildung 25: CD34 BMP inkorporiert

Die niedrige Dosierung von 24 µg BMP lieferte nach 4 Wochen Ergebnisse von 17 Pixel und nach 13 Wochen von 52 Pixel Gefäßneubildung.

Die Konzentration von 48 µg BMP ergab nach 4 Wochen 13 Pixel und nach 13 Wochen 60 Pixel Gefäßbildung. Die höchste Dosierung 96 µg BMP lieferte Werte von 10 Pixel nach 4 Wochen und 67 Pixel nach 13 Wochen (siehe Abb. 25).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die durchgeführte Varianzanalyse fand nach 4 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Konzentrationen ($p=0,563$).

Laufzeit 13 Wochen

Innerhalb dieser Gruppe lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Dosierungen vor ($p=0,006$). Allerdings zeigten die nachfolgenden t-Tests keine signifikanten Unterschiede auf.

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Die durchgeführten t-Test zeigen, dass nach 13 Wochen bei allen verwendeten Konzentrationen von BMP signifikant höhere Ergebnisse vorliegen (24 μg BMP ($p=0,024$), 48 μg BMP ($p=0,004$) und 96 μg BMP ($p=0,006$)).

3.2.1.3 Kombination VEGF mit BMP

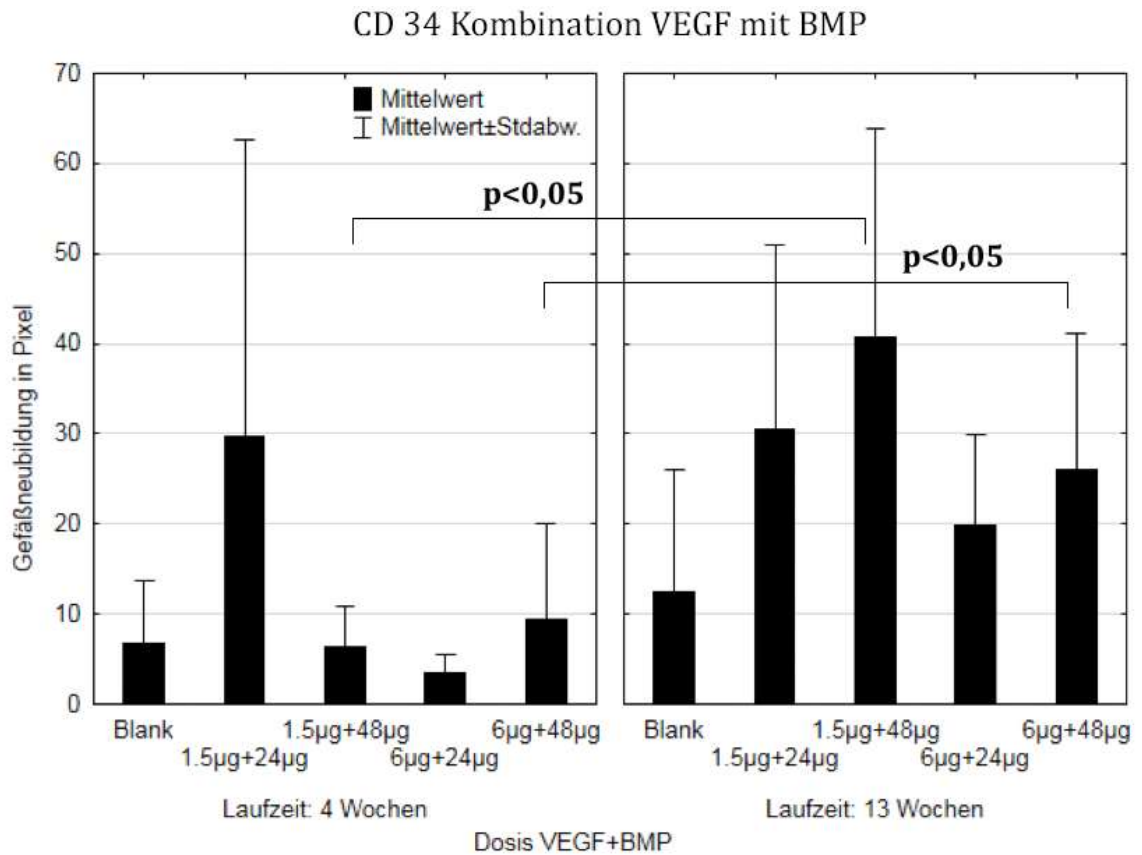


Abbildung 26: CD34 Kombination VEGF mit BMP

Die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP ergab nach 4 Wochen Werte von 30 Pixel und nach 13 Wochen von 30 Pixel. Eine Konzentration von 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zeigte nach 4 Wochen 6 Pixel und nach 13 Wochen 41 Pixel Gefäßneubildung.

Die höchste VEGF-Dosierung von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP lag nach 4 Wochen bei 3 Pixel und nach 13 Wochen bei 20 Pixel. Die Kombination aus 6 µg VEGF mit 48 µg BMP ergab 10 Pixel nach 4 Wochen und 26 Pixel Gefäßzunahme nach 13 Wochen (siehe Abb. 26).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die Varianzanalyse nach 4 Wochen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosisgruppen ($p=0,071$).

Laufzeit 13 Wochen

Die statistische Analyse nach 13 Wochen stellte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen dar ($p=0,084$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Der Vergleich der einzelnen Kombinationen mittels t-Tests zeigte, dass die Kombinationen von 1,5 μg VEGF mit 48 μg BMP ($p=0,014$) und 6 μg VEGF mit 24 μg BMP ($p=0,010$) nach 13 Wochen signifikant höhere Ergebnisse bei der Gefäßneubildung liefern als nach nur 4 Wochen Implantationszeit.

3.2.1.4 Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen die alleinige Gabe von VEGF und BMP

1,5 μg VEGF vs. 1,5 μg VEGF + 24 μg BMP vs. 6 μg VEGF

Die statistische Analyse von 1,5 μg VEGF und 6 μg VEGF gegen 1,5 μg VEGF in Kombination mit 24 μg BMP fand nach 4 und 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen ($p=0,387$), 13 Wochen ($p=0,066$)).

1,5 μg VEGF vs. 1,5 μg VEGF + 48 μg BMP vs. 6 μg VEGF

Die Varianzanalyse ergab nach 4 Wochen Laufzeit keinen signifikanten Unterschied ($p=0,313$).

Nach einer Laufzeit von 13 Wochen fand sich aber ein signifikanter Unterschied ($p=0,010$). Die folgenden t-Tests zeigten, dass die Kombination von 1,5 μg VEGF mit 48 μg BMP zu einem signifikant höheren Ergebnis führt im Vergleich zu 1,5 μg VEGF als Einzeldosis ($p=0,017$).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP

Die durchgeführten t-Tests fanden keine Signifikanzen nach 4 Wochen ($p=0,053$) und 13 Wochen ($p=0,447$) Implantationsdauer.

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP

Die durchgeführten t-Tests zeigten erneut keinen signifikanten Unterschied in der Gefäßbildung nach 4 und 13 Wochen Laufzeit (4 Wochen ($p=0,409$), 13 Wochen ($p=0,182$)).

24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Die statistische Auswertung ergab sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen ($p=0,481$), 13 Wochen ($p=0,126$)).

24 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Die Analyse ergab nach 4 Wochen Laufzeit keinen signifikanten Unterschied ($p=0,135$).

Nach einer Laufzeit von 13 Wochen war die Gabe von 48 µg BMP der Kombination aus 6 µg VEGF mit 24 µg BMP signifikant überlegen ($p=0,009$).

48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Die Varianzanalyse fand sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen ($p=0,532$), 13 Wochen ($p=0,250$)).

48 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p=0,834$).

Nach 13 Wochen fand sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Dosierungen ($p=0,028$).

Die anschließenden t-Tests ergaben, dass die Einzeldosis von 48 μg BMP im Vergleich zur Kombination von 6 μg VEGF mit 48 μg BMP signifikant mehr Gefäßwachstum auslöst ($p=0,020$).

3.2.2 Wachstumsfaktor aufgetropft

3.2.2.1 VEGF

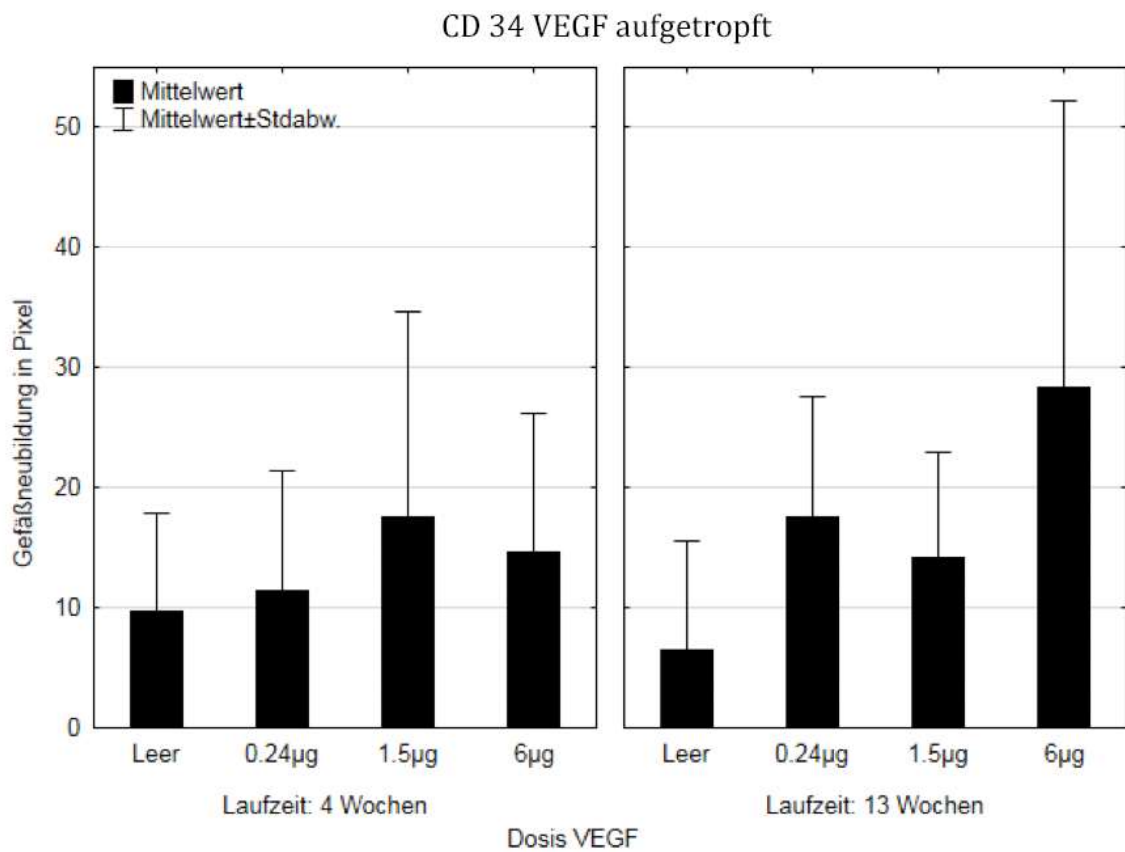


Abbildung 27: CD34 VEGF aufgetropft

Bei einer Dosierung 0,24 μg VEGF zeigte sich nach 4 Wochen eine Gefäßneubildung von 11 Pixel und nach 13 Wochen von 18 Pixel. Die Konzentration von 1,5 μg VEGF ergab Werte von 18 Pixel nach 4 Wochen und von 14 Pixel nach 13 Wochen. Durch die höchste Dosierung von 6 μg VEGF lag der Wert nach 4 Wochen bei 15 Pixel und nach 13 Wochen bei 28 Pixel.

Die Kontrollgruppe mit reinen Leerdefekten zeigte nach 4 Wochen Werte von 10 Pixel und nach 13 Wochen von 7 Pixel (siehe Abb. 27).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die durchgeführte Varianzanalyse fand keine signifikanten Unterschiede ($p=0,683$).

Laufzeit 13 Wochen

Auch nach 13 Wochen Laufzeit zeigte sich keine der verwendeten Konzentrationen signifikant überlegen ($p=0,100$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Der Vergleich der einzelnen Konzentrationen durch t-Tests fand keinen signifikanten Vorteil für eine Implantationsdauer von 13 Wochen gegenüber 4 Wochen.

3.2.2.2 BMP

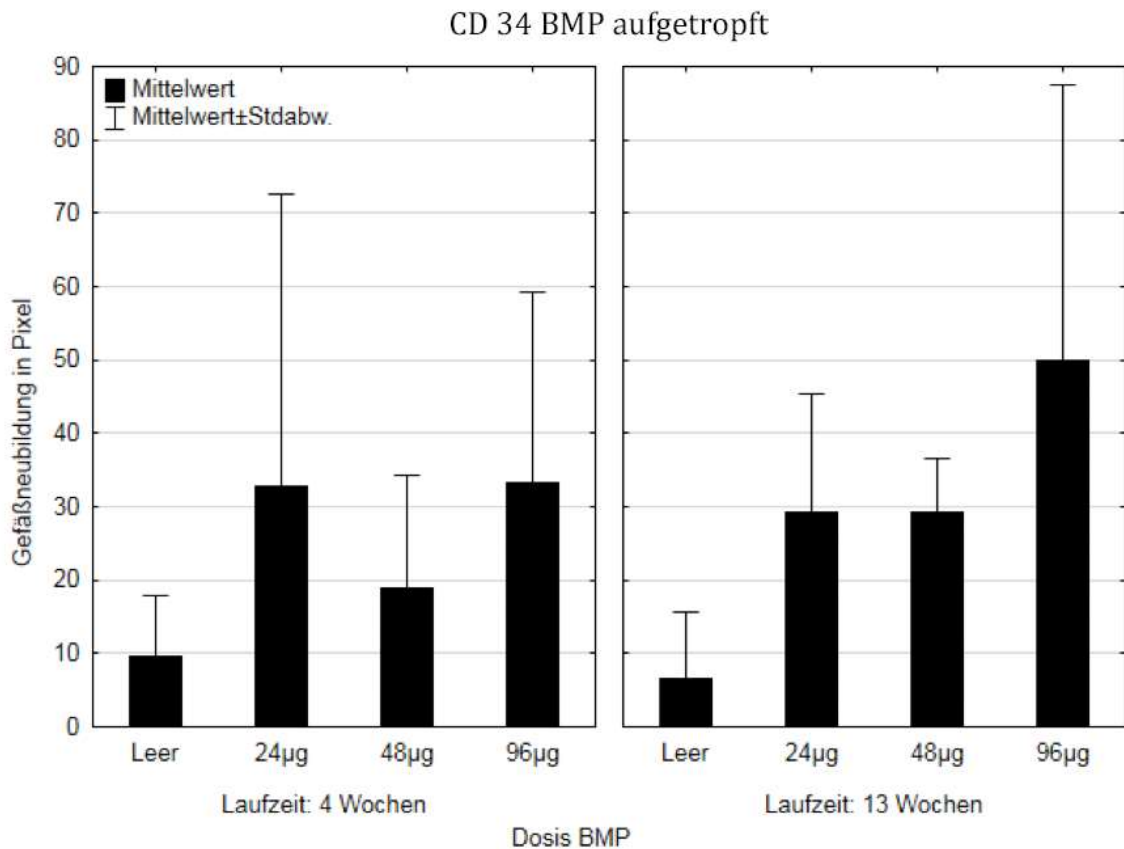


Abbildung 28: CD34 BMP aufgetropft

Die niedrige Dosierung von 24 µg BMP lieferte nach 4 Wochen Ergebnisse von 33 Pixel und 29 Pixel nach 13 Wochen. Die Konzentration von 48 µg BMP ergab nach 4 Wochen 19 Pixel und nach 13 Wochen 29 Pixel Gefäßneubildung. Die höchste Dosierung 96 µg BMP lieferte Werte von 33 Pixel nach 4 Wochen und 49 Pixel nach 13 Wochen Implantationsdauer (siehe Abb. 28).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die Varianzanalyse fand keinen signifikanten Unterschied durch die verschiedenen Dosierungen nach 4 Wochen Laufzeit ($p=0,306$).

Laufzeit 13 Wochen

Innerhalb dieser Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen ($p=0,017$). Die nachfolgenden t-Tests konnten dies jedoch nicht bestätigen.

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Die statistische Analyse der einzelnen Dosierungen von BMP mittels t-Tests für die Laufzeiten von 4 und 13 Wochen fand keine signifikanten Unterschiede, die sich durch eine längere Implantationsdauer ergeben.

3.2.2.3 Kombination VEGF mit BMP

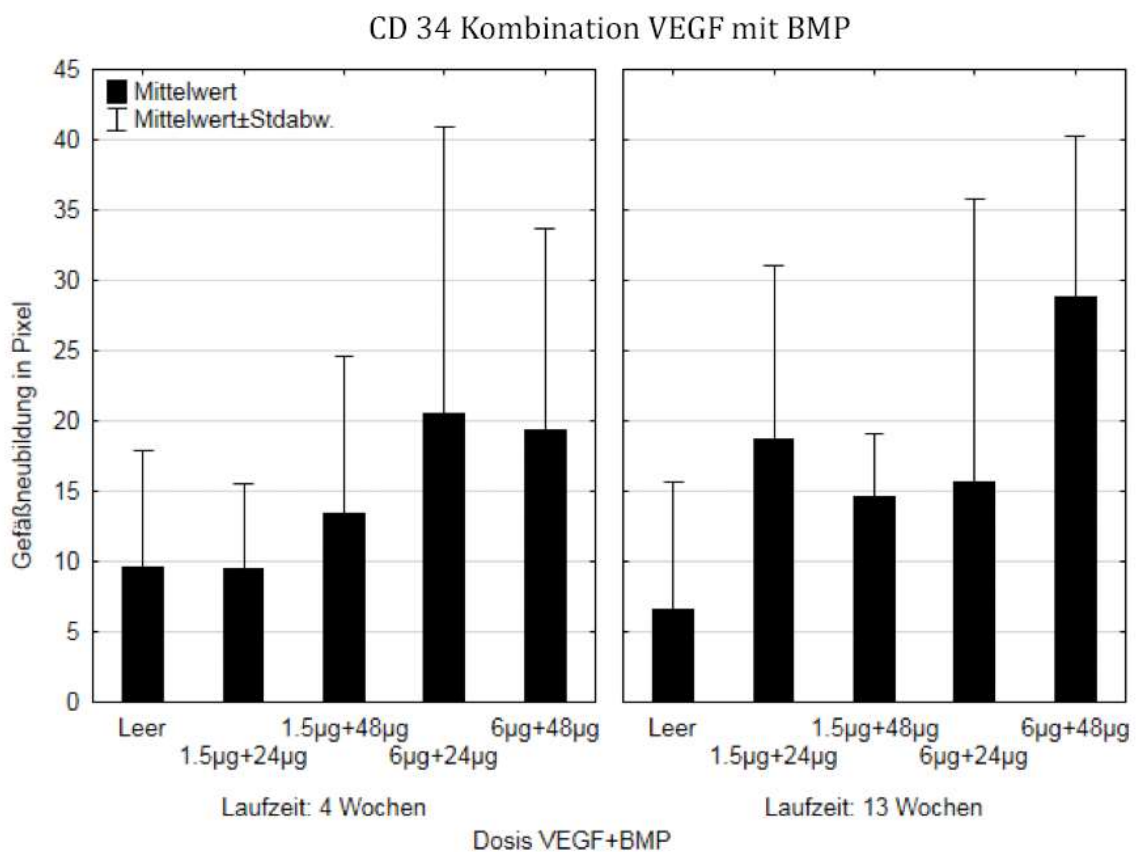


Abbildung 29: CD34 Kombination VEGF mit BMP

Die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP ergab nach 4 Wochen Werte von 10 Pixel und nach 13 Wochen von 19 Pixel. Eine Konzentration von 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP zeigte nach 4 Wochen 14 Pixel und nach 13 Wochen 15 Pixel Gefäßneubildung.

Die höchste VEGF-Dosierung von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP lag nach 4 Wochen bei 21 Pixel und nach 13 Wochen 16 Pixel. Die Kombination aus 6 µg VEGF mit 48 µg BMP ergab 20 Pixel nach 4 Wochen und 29 Pixel Gefäßzunahme nach 13 Wochen (siehe Abb. 29).

Statistische Auswertung

Laufzeit 4 Wochen

Die Analyse nach 4 Wochen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosisgruppen ($p=0,449$).

Laufzeit 13 Wochen

Auch nach 13 Wochen Laufzeit zeigten sich keine Signifikanz zwischen den Kombinationen ($p=0,071$).

Vergleich 4 Wochen mit 13 Wochen Laufzeit

Die statistische Analyse der einzelnen Kombinationen mittels t-Tests für die Laufzeiten von 4- und 13-Wochen fand keine signifikanten Unterschiede, die sich durch eine verlängerte Laufzeit ergeben.

3.2.2.4 Vergleich der Kombination von VEGF mit BMP gegen VEGF und BMP alleine

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die Auswertung zeigte sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen keine signifikant höheren Ergebnisse für die kombinierte Gabe von 1,5 µg VEGF mit

24 µg BMP im Vergleich zur Einzelgabe von 1,5 µg VEGF und 6 µg VEGF (4 Wochen (p=0,533), 13 Wochen (p=0,331)).

1,5 µg VEGF vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 6 µg VEGF

Die statistische Analyse fand keinen Vorteil für die kombinierte Gabe von VEGF mit BMP für das Gefäßwachstum (4 Wochen (p=0,862), 13 Wochen (p=0,204)).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP

Die kombinierte Gabe von 6 µg VEGF mit 24 µg BMP war der alleinigen Gabe von 6 µg sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen nicht signifikant überlegen (4 Wochen (p=0,560), 13 Wochen (p=0,344)).

6 µg VEGF vs. 6 µg VEGF + 48 µg BMP

Bei der Verwendung von 48 µg BMP in Kombination mit 6 µg VEGF fand sich kein signifikanter Vorteil sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen Implantationsdauer (4 Wochen (p=0,542), 13 Wochen (p=0,967)).

24 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Auch hier ergab sich nach 4 als auch nach 13 Wochen Implantationsdauer kein signifikanter Unterschied (4 Wochen p=0,292, 13 Wochen p=0,261).

24 µg BMP vs. 6 µg VEGF + 24 µg BMP vs. 48 µg BMP

Die statistische Analyse fand sowohl nach 4 als auch nach 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen (p=0,649), 13 Wochen (p=0,242)).

48 µg BMP vs. 1,5 µg VEGF + 48 µg BMP vs. 96 µg BMP

Im Zeitraum von 4 Wochen lagen keine signifikanten Unterschiede vor (p=0,193).

Nach 13 Wochen zeigte sich die Gabe von 96 μg BMP der kombinierten Gabe von 1,5 μg VEGF mit 48 μg BMP signifikant überlegen ($p=0,003$) (siehe Abb. 30).

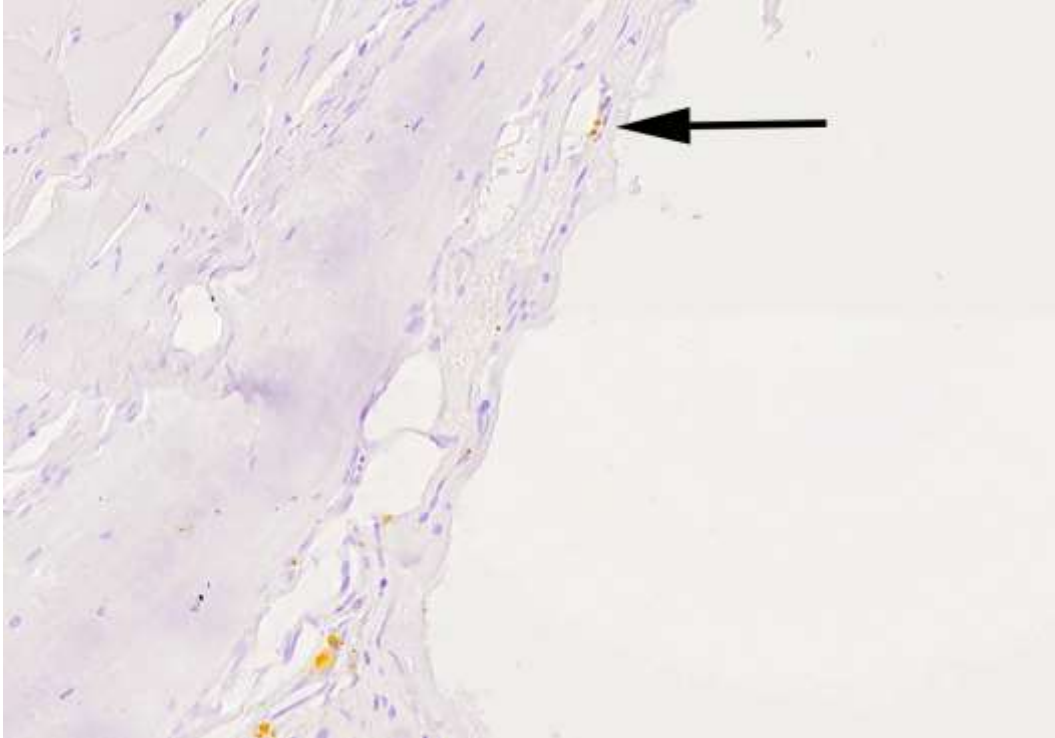


Abb. 30 a: 1,5 μg VEGF + 48 μg BMP nach 13 Wochen

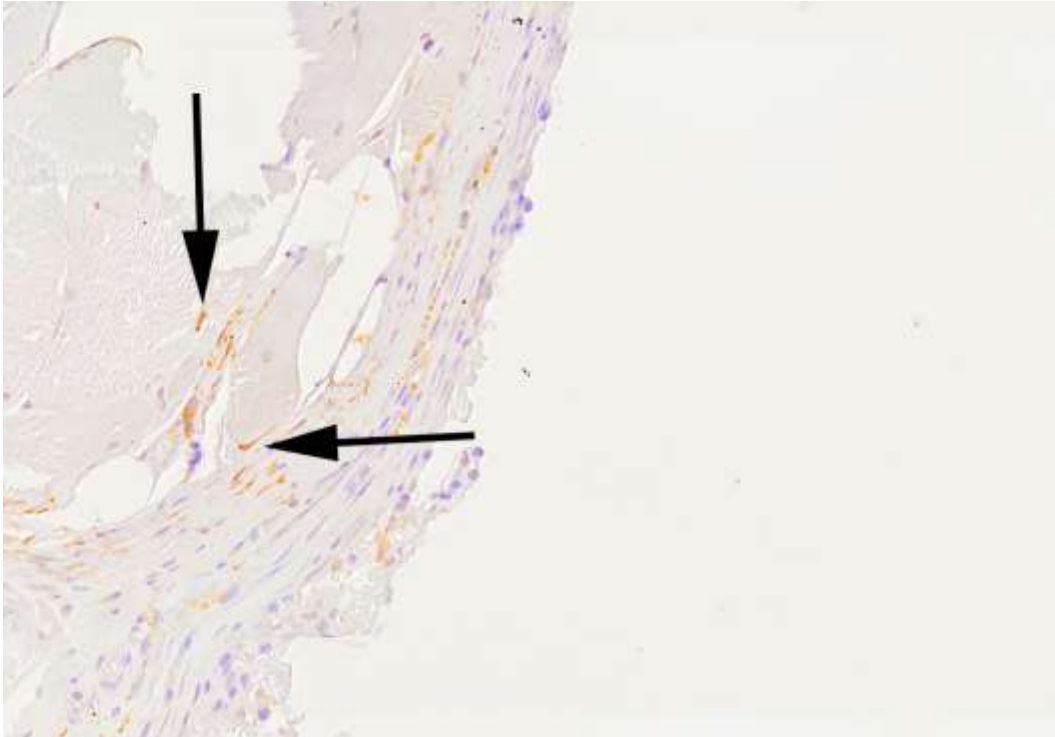


Abb. 30 b: 96 μ g BMP nach 13 Wochen

Abbildung 30 a; b: Nach 13 Wochen Implantationsdauer lagen bei 96 μ g BMP im Vergleich zur Kombination aus 1,5 μ g VEGF + 48 μ g BMP signifikant mehr positiv gefärbte Areale vor

48 μ g BMP vs. 6 μ g VEGF + 48 μ g BMP vs. 96 μ g BMP

Die statistische Auswertung fand sowohl nach 4- als auch nach 13-Wochen keine signifikanten Unterschiede (4 Wochen ($p=0,361$), 13 Wochen ($p=0,230$)).

3.2.3 Vergleich Wachstumsfaktor inkorporiert gegen Wachstumsfaktor aufgetropft

Hierbei zeigte sich, dass nach 13 Wochen die Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP im inkorporierten Herstellungsverfahren, bei Pixelwerten von 41, dem Polylaktidträger mit aufgetropften Wachstumsfaktoren mit einem Wert von nur 15 Pixel signifikant überlegen ist ($p=0,022$).

Alle anderen Vergleiche waren nicht signifikant. (siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Vergleich inkorporiert gegen aufgetropft (signifikante Werte unterstrichen)

Dosis	4 Wochen Laufzeit p-Wert	13 Wochen Laufzeit p-Wert
Kontrolle (Blank +Leer)	0,499	0,458
24 µg BMP	0,311	0,137
48 µg BMP	0,919	0,058
96 µg BMP	0,063	0,444
0,24 µg VEGF	0,627	0,717
1,5 µg VEGF	0,271	0,454
6 µg VEGF	0,883	0,106
1,5 µg VEGF + 24 µg BMP	0,290	0,304
1,5 µg VEGF + 48 µg BMP	0,225	<u>0,022</u>
6 µg VEGF + 24 µg BMP	0,109	0,631
6 µg VEGF + 48 µg BMP	0,355	0,737

4 Diskussion

Knochendefekte im Bereich des Gesichtsschädels durch Tumorerkrankungen, nach Unfällen oder angeborene Fehlbildungen können durch die Verwendung von körpereigenem Knochen therapiert werden. Damit ist jedoch ein ausgedehnter operativer Aufwand verbunden und im gesunden Entnahmegebiet des autologen Knochens können Komplikationen auftreten. Nach erfolgter Einheilung des Transplantats verbleiben die zur Fixierung verwendeten Osteosynthesematerialien und können nur durch einen erneuten chirurgischen Eingriff entfernt werden. Die operative Belastung des Patienten geht mit einer Steigerung der Kosten für das Gesundheitssystem einher.

Die Verwendung allogener oder xenogener Transplantate birgt das Risiko von Abstoßungsreaktionen durch das körperfremde Gewebe und zusätzlich die Gefahr von Infektionen durch virale oder andere Erkrankungen (Gürtler 1994, Schratt und Spyra 1997, Simonds et al. 1992).

Alloplastische Materialien wie Titan oder Keramiken sind nicht abbaubar und können lediglich als Knochenleitstruktur dienen (Yang et al. 2001).

Ziel der Forschung ist es daher, benötigte Signalproteine im Bereich des Defekts wirken zu lassen und so den fehlenden Knochen durch körpereigene Regeneration wachsen zu lassen.

Die grundsätzliche Wirksamkeit angiogener und osteogener Wachstumsfaktoren bei der Rekonstruktion von Gesichtsknochen ist in der Vergangenheit bereits gezeigt worden. Hierbei wurden in der überwiegenden Zahl Trägermaterialien wie Kollagenvliese oder Schwämme zur Abgabe der Signalproteine verwendet (Bostrom et al. 1996, Boyne et al. 1997, Gerhart et al. 1993, Kleinheinz et al. 2002).

Durch die geringe Stabilität der Kollagenträger gegenüber mechanischen Einflüssen im Implantationsgebiet konnte diesen keine klinisch zuverlässige Einsatzfähigkeit bescheinigt werden (Bergh et al. 2000, Cochran et al. 2000).

Anfängliche Versuche zur Beladung von Polylaktidpolymeren konnten einen osteoinduktiven Effekt aufzeigen, allerdings unterschied sich die Abgabekinetik nicht von derjenigen der bereits etablierten Kollagenträger (Weber et al. 2002), die teilweise 80 % Ihrer Dosis in den ersten 48 Stunden nach Implantation abgaben (Friedlaender et al. 2001, Uludag et al. 2000).

Die Beladung von Polylaktid-Implantaten mit BMP wurde bereits *in vitro* als auch *in vivo* evaluiert. Es konnte eine kontinuierliche Freisetzung der Wachstumsfaktoren *in vitro* mit resultierender Knochenneubildung *in vivo* gezeigt werden. Sowohl im ektopen als auch im orthotopen Lager fand eine Knochenneubildung statt (Gruber et al. 2009, Schliephake et al. 2007, Schliephake et al. 2008).

Bei diesen Versuchen kam es jedoch durch saure Abbauprodukte der Milchsäurepolymere zu einer Resorption des neugebildeten Knochens.

Studien im ektopen Rattenmodell beschreiben eine moderate Fremdkörperreaktion im Umkreis der Polylaktidimplantate, welche als Reaktion auf die sauren Degradationsprodukte oder konstante Bewegung der Implantate im Muskellager zurückgeführt wird (Bostman et al. 1990, Chang et al. 2007). Durch die Beimengung von Kalziumkarbonat kann eine effektive Pufferung der sauren Abbauprodukte erreicht werden (Schiller et al. 2004, Weihe et al. 2004).

Andere Studien zeigten, dass der Zusatz von VEGF die Gefäßneubildung und damit eine raschere Knochenneubildung *in vivo* bewirken kann (Kleinheinz et al. 2002, Street et al. 2002). Diese Untersuchungen deckten jedoch nur kurze Betrachtungszeiträume von 14- bis 28-Tage ab.

Rolle der Angiogenese für die Osteogenese

Die Entstehung neuer Gefäße zur Gewebereparatur (Arnold und West 1991) und zum Gewebewachstum ist ein essentieller Prozess auch bei der Knochenreparatur (Goad et al. 1996). Bovine Knochenzellen produzieren Wachstumsfaktoren (Globus et al. 1989), die auch die Angiogenese stimulieren. Dies verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Vaskularisation

und Osteogenese und legt nahe, dass durch eine Verbesserung der Gefäßversorgung eine Optimierung der Knochenreparatur erreicht werden kann.

Das verwendete rh-VEGF-165 spielt eine zentrale Rolle im Ablauf der Osteogenese, da die Gefäßversorgung den limitierenden Faktor der Knochenneubildung darstellt (Street et al. 2002).

Nach der Untersuchung der Angiogenese und Osteogenese unter Einfluss von freigesetztem VEGF in einem Unterkieferdefektmodell am Kaninchen schlussfolgerte Kleinheinz, dass es zu einer deutlichen Verstärkung und Verlängerung der Angiogenese mit ausgeprägteren Knochenregeneration kommt (Kleinheinz et al. 2002). Auch die Untersuchungen von Geiger kamen zu diesem Ergebnis (Geiger et al. 2005, Geiger et al. 2007).

Implantation von Kombinationspräparaten

Von großem Interesse war es zu untersuchen, ob die Kombination zweier Wachstumsfaktoren zu einem gleichwertigen oder überlegenen Ergebnis führt und so einer der Faktoren reduziert werden kann.

Ziel war es die verwendete Dosis in Anbetracht der möglichen Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten.

Tiermodell

Zur Untersuchung der Biokompatibilität und biologischen Aktivität der eingebrachten Träger eignen sich Kleintiere wie Mäuse oder Ratten, da die Untersuchung großer oder komplexer Versuchsgruppen mit einem verhältnismäßig geringen finanziellen Aufwand betrieben werden kann.

Weiterhin weisen Ratten im Vergleich zum Menschen eine fünffach schnellere Wundheilung auf.

Nachteilig ist das bei Kleinnagern niedriger entwickelte Knochengewebe ohne Havers-Systeme. Dies erschwert die Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen (Coulson 1983, Liebschner 2004, Nunamaker 1998, Sato und Urist 1985).

Großtiermodelle dienen der Vorbereitung der klinischen Erprobung am Menschen. Sie ermöglichen eine menschenähnlichere Untersuchung der mechanischen Anforderungen durch eine vergleichbare Anatomie, sind aber durch die längeren Beobachtungszeiträume und großen Versuchsgruppen finanziell aufwendiger.

Einfluss der Abgabekinetik

In vorangegangenen Studien mit osteogenen Wachstumsfaktoren wurde deren Wirksamkeit bereits umfangreich untersucht. Die Beladung erfolgte durch das Auftropfen des Wachstumsfaktors auf die jeweiligen Träger. Diese gaben in den ersten zwei bis drei Tagen bolusartig den Großteil ihres Wachstumsfaktors ab, was sich als typischer Abgabemodus für diese Art der Trägerbeladung herausstellte (Friedlaender et al. 2001, Uludag et al. 2000). Andere poröse Träger wie Hyaluronsäure-Schwämme, die ebenfalls durch Auftropfen des Faktors beladen wurden, zeigten vergleichbare Ergebnisse (Arosarena und Collins 2005).

Dies suggeriert einen eher untergeordneten Einfluss des Trägermaterials bei der bolusartigen Abgabekinetik. Wechselwirkungen des Trägers mit dem Implantationsgebiet scheinen durch den anfänglichen Überfluss an Wachstumsfaktor verschleiert zu werden (Gruber et al. 2009).

Auch in unserer Studie zeigten die nur durch Auftropfen beladenen Träger eine nach 4 Wochen signifikant höhere Gefäßneubildung im Vergleich zu den Trägern mit inkorporiertem VEGF.

Die von uns verwendeten Polylaktidträger mit inkorporiertem Wachstumsfaktor ermöglichen eine anhaltende Abgabe von BMP. Charakteristisch war eine erhöhte Abgabe in den ersten 24- bis 48-Stunden mit anschließender kontinuierlicher Freisetzung, abhängig von der anfänglich eingebrachten Menge an Wachstumsfaktor (Gruber et al. 2009).

In-vivo-Vergleiche zwischen 48 µg und 96 µg BMP zeigten keine Knochenneubildung bei 48 µg BMP, trotz anfänglich höherer Abgabe von BMP. Die höher dosierten Träger waren in der Lage über längere Zeit höhere

Dosen abzugeben und so eine Knochenneubildung anzuregen. Daraus lässt sich schließen, dass nicht die bolusartige Abgabekinetik, sondern eine fortlaufend hohe Abgabe an Wachstumsfaktor über einer bestimmten Grenzdosis eine dauerhafte Gewebsneubildung anregen kann (Gruber et al. 2009).

Richardson berichtete über einen additiven Effekt von VEGF beim Einleiten der Angiogenese mit einer ähnlichen Abgabekinetik aus aufgeschäumten Polylaktidträgern. Auch hier zeigte sich eine anfänglich bolusartige Abgabe in den ersten zehn Tagen mit einer anschließenden fast linearen Abgabe in den folgenden Wochen. Vermutet wurde eine oberflächliche Konzentrierung des VEGFs im Träger durch den Herstellungsprozess (Richardson et al. 2001).

Beide Studien suggerieren eine Zwei-Stufen-Kinetik der Polylaktidträger mit einer anfänglich schnellen Abgabe des oberflächlich gebundenen Faktors und einer folgenden langsameren Abgabe des inkorporierten Wachstumsfaktors durch Abbau des Trägers. Zusätzlich scheint die Menge und Dauer der Freisetzung an Wachstumsfaktor von der anfänglich eingesäumten Menge an Wachstumsfaktor abzuhängen (Schliephake et al. 2007).

Implantatlager

Neben der Art des verwendeten Trägers spielt auch der gewählte Ort der Implantation eine große Rolle für die Interpretation der zu erwartenden Ergebnisse.

Es wird zwischen orthotoper und ektopter Implantation unterschieden. Bei der orthotopen Implantationsform erfolgt eine Einbringung des Trägers in ein Gewebe gleicher Art. Entsprechend wäre dies im vorliegenden Fall eine ossäre Implantation bei der Betrachtung von BMP.

Dieses Vorgehen eignet sich besonders, um knochenspezifische Mechanismen mit realitätsnahen Einflüssen, z.B. durch mechanische Belastung im Rahmen der Heilungsprozesse, darzustellen (Baas et al. 2010). Da im orthotopen Modell ein Lager vorhanden ist, welches die benötigten Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten) in großer Anzahl

enthält, sind hier höhere und schnellere Ergebnisse zu erwarten (Hanada et al. 2001). Durch das ersatzstarke Implantatlager kann es auch zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen. Eine von Kruyt durchgeführte Untersuchung zur Knochenneubildung im orthotopen Lager konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten Leitschienen aus Kalziumphosphat und unbesiedelten Leitschienen zeigen. Im ektopen Lager fanden sich jedoch nur bei besiedelten Leitschienen die gesuchten Knochenstrukturen (Kruyt et al. 2004, Kruyt et al. 2007).

Eine ektople Implantation erfolgt in einem fremden Gewebe wie z.B. der Subkutis, dem Peritoneum oder wie in unserem Fall der glutealen Muskulatur (Ishaug-Riley et al. 1997). Das Muskellager wurde dem subkutanen Lager vorgezogen, da eine größere Population induzierbarer mesenchymaler Zellen vermutet wird. Da im Muskelgewebe nur sehr wenige Osteoprogenitorzellen vorhanden sind, müssen diese zunächst rekrutiert werden oder durch Umwandlung aus pluripotenten Mesenchymzellen entstehen. Im ektopen Modell wird angenommen, dass nur die iatrogen eingebrachten Faktoren einen Einfluss ausüben. Der zu erwartende Effekt sollte geringer ausfallen als im orthotopen Modell, jedoch hat das Ergebnis durch das Fehlen von Störfaktoren eine höhere Aussagekraft.

Da die vorliegende Arbeit zu einer größer angelegten Untersuchung zur Knochenregeneration gehört und sich nur als Teilaufgabe mit dem vaskulären Anteil befasst, soll eine unverfälschte Betrachtung der vaskulären Stimulation durch VEGF in Kombination mit BMP erfolgen. Daher wurde ein ektopes Implantationsschema ausgewählt. Durch das Fehlen mechanischer Einflüsse und osteoinduktiver Potentiale des Periosts ist eine exakte Übertragung der Ergebnisse vom ektopen Modell auf ein orthotopes Modell nicht möglich (Kruyt et al. 2004).

CD31- und CD34-Antigene

Es sind verschiedene spezifische Endothelmarker bekannt. Das von uns markierte CD31 ist ein Transmembranglykoprotein und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Vorhanden ist es auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen. Weiterhin ist es auf Endothelzellen lokalisiert und spielt als Bestandteil der Zell-Zell-Junktionen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und der Interaktion mit Leukozyten (Pusztaszeri et al. 2006). CD31 findet breite Anwendung durch seine hohe Spezifität und Sensitivität für Endothelzellen. Von Nachteil kann die Kreuzreaktion mit Plasmazellen sein, welche zu einer Maskierung der Mikrogefäße führen kann (Weidner 1995).

CD34 ist ebenfalls ein Transmembranglykoprotein, welches auf Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist. Seine genaue Funktion ist bisher unklar (Pusztaszeri et al. 2006), vermutlich spielt CD34 unter anderem eine Rolle bei der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen und bei der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen bei Entzündungen (Krause et al. 1996). Der Antikörper gegen CD34 besitzt eine hohe Spezifität für Endothelzellen kleinerer Gefäße. Von Nachteil ist jedoch die positive Reaktion auch auf perivaskuläre Stromazellen (Weidner 1995).

Bei der Auswertung der von uns gegen CD31 und CD34 gefärbten Präparate ließen sich die braun gefärbten Endothelien deutlich vom Hintergrund unterscheiden.

Analysiert wurden Zeiträume von 4- und 13-Wochen mit drei verschiedenen Konzentrationen für VEGF und BMP. Zusätzlich wurden vier Kombinationen von VEGF mit BMP betrachtet, um mögliche Wechselwirkungen zu finden.

CD31

Im Vergleich von VEGF als Einzeldosis gegen VEGF in Kombination mit BMP konnte gezeigt werden, dass bei den inkorporierten Trägern eine höhere VEGF-Konzentration sowohl nach 4- als auch nach 13-Wochen zu einer

signifikanten Zunahme der Gefäße führt. Auch die längere Implantationszeit von 13 Wochen erzeugt eine signifikant höhere Gefäßbildung.

Diese Aussagen können jedoch für die gleichen Konzentrationen im aufgetropften Herstellungsverfahren nicht übernommen werden. Allerdings zeigten sich die getränkten Träger bei der kurzen Implantationszeit von 4 Wochen in mehreren Fällen den inkorporierten Trägern überlegen.

Eine Erhöhung der BMP Dosis führte unabhängig von der Beladungsart nicht zu mehr Gefäßen. Nur die Verwendung von 24 µg BMP in inkorporierter Form zeigte nach einer Implantationszeit von 13 Wochen eine signifikante Zunahme der Gefäße. Hierbei sollte aber auch die Abbaureaktion der Polylaktidtabletten durch das Gewebe als Einflussfaktor mit in Betracht gezogen werden.

Im Vergleich der inkorporierten Kombinationen von VEGF mit BMP gegenüber VEGF als Einzelgabe stellte sich keins der Kombinationspräparate als überlegen heraus. Dies verdeutlicht den untergeordneten Einfluss von BMP auf die Angiogenese.

Bei dem Vergleich der Kombinationen von VEGF mit BMP gegenüber BMP als Einzelgabe waren die Kombinationspräparate erst nach 13 Wochen dem BMP signifikant überlegen.

Bei den aufgetropften Trägern ist die Kombination meist schon nach 4 Wochen der BMP Einzelgabe überlegen.

Dies bestätigt, dass aufgetropfte VEGF-Träger bereits nach kurzer Zeit mehr Gefäße bilden können.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Polylaktidträger mit inkorporierten Wachstumsfaktoren nicht nur, wie bereits mehrfach beschrieben, BMP (Gruber et al. 2009, Schliephake et al. 2007, Schliephake et al. 2008), sondern auch VEGF über einen längeren Zeitraum abgeben können und so eine dauerhafte Gefäßneubildung aufrechterhalten.

Auch wenn die Werte der aufgetropften Träger nach dem Betrachtungszeitraum von 4 Wochen den inkorporierten Trägern signifikant

überlegen waren, zeigen sich im Trend höhere Pixelwerte bei den inkorporierten Trägern nach 13 Wochen. Die Werte waren jedoch nicht signifikant überlegen.

In den Kontrollgruppen führten die unbeladenen Polylaktidträger nach 13 Wochen zu signifikant mehr Gefäßen als die Leer-Kontrollen. Dies deutet nicht unbedingt auf gefäßinduktive Eigenschaften des Polylaktids hin, sondern könnte eher ein Phänomen des Polymerabbaus mit leichter Fremdkörperreaktion und Gefäßbildung zum Abtransport der Abbauprodukte darstellen. Dieser Vorgang könnte das signifikant höhere Ergebnis von 24 µg BMP bei den inkorporierten Trägern nach 13 Wochen erklären.

CD34

Die analoge Auswertung von CD34 führte nicht zu so eindeutigen Ergebnissen und die gewonnenen Mittelwerte hatten eine höhere Standardabweichung als die von CD31.

Weder die Träger mit inkorporiertem VEGF noch mit aufgetropftem VEGF führten im Vergleich der verwendeten Konzentrationen zu einer signifikant höheren Gefäßbildung bei Erhöhung der Dosis oder Verlängerung der Implantationszeit von 4- auf 13-Wochen. Ähnlich stellte es sich auch bei der Auswertung von BMP dar. Lediglich bei dem inkorporierten BMP führte bei allen Dosierungen eine Verlängerung der Laufzeit auf 13 Wochen zu signifikant höheren Ergebnissen.

Dies könnte, wie auch schon bei CD31 vermutet, eine Reaktion des Körpers auf den Polymerabbau darstellen, welche eine gewisse Vorbereitungszeit benötigt.

Die Kombination von VEGF mit BMP ergab keinen signifikanten Vorteil für eine Applikationsform oder Wirkstoffkombination. Die Träger mit inkorporierten Wachstumsfaktoren zeigen bei einer Verlängerung der Implantationszeit von 4- auf 13-Wochen signifikant höhere Pixelwerte.

Bei den inkorporierten Kombinationen von VEGF mit BMP fand sich gegenüber VEGF als Einzeldosis nach 13 Wochen nur für die Kombination von 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP ein höheres Ergebnis gegenüber 1,5 µg VEGF als Einzeldosis. Auffällig war, dass im Vergleich zur Kombination mit BMP als Einzeldosis zweimal das BMP nach 13 Wochen zu höheren Werten führte. Es ist bekannt, dass auch kollagenbildende Fibroblasten und Spindelzellen sich positiv gegen CD34 anfärben lassen (Sirgi et al. 1993). Möglicherweise wurden diese Zelltypen von BMP stimuliert und führten zu diesem unerwarteten Ergebnis.

Da nicht alle Funktionen von CD34 bisher bekannt sind und unsere Auswertung von CD31 eindeutig den untergeordneten Einfluss von BMP auf Endothelzellen zeigte, sollte die genaue Funktion von CD34 weiter evaluiert werden.

Vergleicht man die Kombinationen der Wachstumsfaktoren mit den Einzelgaben von VEGF oder BMP bei den durch Auftropfen beladenen Polylaktidträgern, findet sich nur einmal ein signifikant höheres Ergebnis nach 13 Wochen bei der Einzeldosis von 96 µg BMP gegenüber der Kombination aus 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP. Im Vergleich der beiden Herstellungsverfahren war erneut nach 13 Wochen die durch Inkorporation produzierte Kombination von 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP der aufgetropften signifikant überlegen.

Es fanden sich bei der Betrachtung der Angiogenese keine eindeutigen Hinweise darauf, dass sich durch die kombinierte Gabe von VEGF mit BMP einer der Faktoren einsparen lässt.

5 Zusammenfassung

Knochendefekte des Gesichtsschädels sind mit einem enormen Behandlungsaufwand verbunden. In der Therapie liegt der Fokus nicht nur auf der funktionellen Rekonstruktion, sondern auch auf einer für den Patienten zufriedenstellenden ästhetischen Rehabilitierung.

Aktueller Goldstandard der klinischen Therapie ist das autogene Knochentransplantat. Aus der für die Entnahme des Transplantats und Entfernung von Osteosynthesematerial erforderlichen Zweit- und Drittoperation resultiert eine erhöhte Morbidität des Patienten.

Es besteht ein besonderes Interesse an alternativen Therapiemöglichkeiten durch Implantation von Ersatzmaterialien mit gewebeinduzierender Wirkung. Dabei spielt neben der Osteogenese die Angiogenese eine Schlüsselrolle.

In der vorliegenden Arbeit dienten Polylaktidimplantate als Trägermaterial für die Wachstumsfaktoren VEGF und BMP. Diese Träger wurden in die gluteale Muskulatur männlicher Wistar-Ratten implantiert. Die Beladung der Träger mit Wachstumsfaktor erfolgte durch Aufschäumen des Polylaktids mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor, oder der Wachstumsfaktor wurde auf die Polylaktidträger aufgetropft. Die Versuchstiere wurden nach einer Laufzeit von 4- bzw. 13-Wochen geopfert, die Muskulatur samt Träger entnommen und in Dünnschliffen aufbereitet. Nach immunhistochemischer Färbung für CD31 und CD34 wurden die neu entstandenen Gefäßareale vermessen.

Die CD31-Färbung zeigte, dass höhere VEGF-Konzentrationen bei den durch Inkorporation beladenen Trägern zu mehr Gefäßwachstum führen. Auch nach einer Implantationszeit von 13 Wochen blieb dies konstant. In der Gruppe mit betropften Trägern war dies nicht zu beobachten, obwohl sie nach 4 Wochen den durch Inkorporation des VEGF hergestellten Trägern überlegen waren.

Auch die Kombination von VEGF mit BMP ist VEGF als Einzelgabe nicht überlegen.

Die Auswertung von CD34 fand weder bei den durch Inkorporation hergestellten Trägern noch bei den aufgetropften Trägern signifikant höhere Ergebnisse durch eine Erhöhung der VEGF-Dosis oder Verlängerung der Implantationszeit. Die verwendeten Kombinationen von VEGF mit BMP zeigten bei den eingeschäumten Wachstumsfaktoren signifikant höhere Werte durch eine Verlängerung der Implantationszeit von 4- auf 13-Wochen. Nach 13 Wochen Laufzeit war nur die Kombinationen aus 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP der Einzelgabe von 1,5 µg VEGF signifikant überlegen. Unerwartet war auch, dass die Einzelgabe von BMP in zwei Fällen zu einem signifikant höheren Ergebnis führte als die Kombination von BMP mit VEGF.

Bei den durch Auftropfen beladenen Trägern zeigte sich das BMP auch in einem Fall der Kombination aus VEGF mit BMP überlegen.

Möglicherweise werden durch das BMP verstärkt Antigene gebildet, die sich durch den Anti-CD34-Antikörper färben lassen. Es sind nach wie vor nicht alle Funktionen des Oberflächenmarkers CD34 erforscht.

Im Vergleich der beiden Herstellungsverfahren waren nach 13 Wochen erneut die Werte der durch Inkorporation hergestellten Träger signifikant überlegen.

Schlussfolgerungen:

1. Inkorporiertes VEGF kann aus präformierten Polylaktidträgern mit Kalziumkarbonatzusatz über einen Zeitraum von 13 Wochen abgegeben werden und führt zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßbildung.
2. Nach 4 Wochen Laufzeit zeigt sich die Beladung durch Auftropfen überlegen.
3. Es lassen sich bei der etablierten CD31-Färbung keine Hinweise auf eine gefäßinduzierende Wirkung durch BMP finden.
4. Die Färbung mit CD34-Antikörpern führt zu teils höheren Werten für BMP im Vergleich zu VEGF und impliziert weiteren Forschungsbedarf zur Aufklärung aller Funktionen von CD34.

5. Für zukünftige Studien empfiehlt sich aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse ein kombiniertes Beladungsverfahren der Polylaktidträger durch Inkorporieren eines Teils des Wachstumsfaktors und zusätzliches Auftropfen des anderen Teils.

6 Anhang

Nachdruckgenehmigung für die Abbildungen-1. und -2. durch den Springer Verlag.

SPRINGER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Nov 22, 2016

This Agreement between Florian Obermeyer ("You") and Springer ("Springer") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer and Copyright Clearance Center.

License Number	3986060803956
License date	Nov 11, 2016
Licensed Content Publisher	Springer
Licensed Content Publication	Der Ophthalmologe
Licensed Content Title	Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese
Licensed Content Author	A.M. Jousen
Licensed Content Date	Jan 1, 2003
Licensed Content Volume Number	100
Licensed Content Issue Number	4
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Author of this Springer article	No
Order reference number	
Original figure numbers	Figure 1. (Abb.1) and 2.(Abb.2)
Title of your thesis / dissertation	Angiogene Auswirkung der retardierten Freisetzung von rh-BMP-2 und rh-VEGF im Muskel der Ratte. Immunhistochemische Auswertung CD 31 und CD 34
Expected completion date	Jun 2017

7 Literaturverzeichnis

Alt V, Donell ST, Chhabra A, Bentley A, Eicher A, Schnettler R (2009): A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo–Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. *Injury* 40, 1269-1275

Arnold F, West DC (1991): Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 52, 407-422

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

Ashara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner J (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228

Baas E, Kuiper JH, Yang Y, Wood MA, El Haj AJ (2010): In vitro bone growth responds to local mechanical strain in three-dimensional polymer scaffolds. *J Biomech* 43, 733-739

Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998): A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125, 1591-1598

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z (2000): Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744

Bergh Jvd, Bruggenkate Ct, Groeneveld H, Burger E, Tuinzing D (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

Bostman O, Hirvensalo E, Makinen J, Rokkanen P (1990): Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br* 72, 592-596

Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T (1996): Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 327, 272-282

- Boyne P, Marx RE, Nevins M, Lazaro E, Lilly Le AM, Nummikoski P (1997): A feasibility study evaluating rhbmp-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Period Restor Dent* 17, 11-25
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W (1992): Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114, 521-532
- Bustos-Valenzuela JC, Fujita A, Halcsik E, Granjeiro JM, Sogayar MC (2011): Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells. *BMC Res Notes* 4, 370
- Carmeliet P, Lampugnani M G, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M (1999): Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98, 147-157
- Carreira A, Lojudice F, Halcsik E, Navarro R, Sogayar M, Granjeiro J (2014): Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93, 335-345
- Chang PC, Liu BY, Liu CM, Chou HH, Ho MH, Liu HC, Wang DM, Hou LT (2007): Bone tissue engineering with novel rhBMP2 - PLLA composite scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A* 81, 771-780
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004): Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233-241
- Chen G, Deng C, Li Y-P (2012): TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8, 272
- Choi K (1998): Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* 76, 947-956
- Cima L, Vacanti J, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R (1991): Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 113, 143-151
- 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
- Colin C, Demasi M, Degaki T, Bustos-Valenzuela J, Figueira R, Montor W, Cruz L, Lojudice F, Muras A, Pereira T (2008): NUCEL (Cell and Molecular Therapy

Center): a multidisciplinary center for translational research in Brazil. *Mol Biotechnol* 39, 89-95

Coulson RA (1983): Relationship between fluid flow and O₂ demand in tissues in vivo and in vitro. *Perspect Biol Med* 27, 121-126

DeVine JG, Dettori JR, France JC, Brodt E, McGuire RA (2012): The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evid Based Spine Care J* 3, 35

Dimar JR, Glassman SD, Burkus KJ, Carreon LY (2006): Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine* 31, 2534-2539

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25

Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676

Fong G-H, Zhang L, Bryce D-M, Peng J (1999): Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 126, 3015-3025

Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S (2001): Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83, S151-S158

Fujimura K, Bessho K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka 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

Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W (2005): Vascular Endothelial Growth Factor Gene - Activated Matrix (VEGF165 - GAM) Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Large Segmental Bone Defects. *J Bone Miner Res* 20, 2028-2035

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

Gerhart TN, Kirker-Head C, Kriz M, Holtrop M, Hennig G, Hipp J, Schelling S, Wang E (1993): Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293, 317-326

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

Goad D, Rubin J, Wang H, Tashjian Jr A, Patterson C (1996): Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137, 2262-2268

Gruber R, Weich H, Dullin C, Schliephake H (2009): Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactid acid and rhBMP - 2. *Clin Oral Implants Res* 20, 24-30

Gürtler L (1994): Blood-borne viral infections. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5, 5-10

Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B (2001): BMP - 2 induction and TGF - β 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81, 284-294

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA (2002): Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637

Hing KA (2004): Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans R Soc Lond A Math Phys Eng Sci* 362, 2821-2850

Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Hirano A, Nishida M, Kawada J, Yamashita K, Takagi T (1994): Histological changes of implanted collagen material during bone induction. *J Biomed Mater Res* 28, 97-103

Ishaug-Riley S, Crane G, Gurlek A, Miller M, Yasko A, Yaszemski M, Mikos A (1997): Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* 36, 1-8

Joussen A, Kirchhof B, Gottstein C (2003): Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologie* 100, 284-291

- Katoh T, Sato K, Kawamura M, Iwata H, Miura T (1993): Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 287, 266-275
- Kim I, Kim HG, Moon S-O, Chae SW, So J-N, Koh KN, Ahn BC, Koh GY (2000): Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 86, 952-959
- Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95, 189-197
- Kleinheinz J, Wiesmann H-P, Stratmann U, Joos U (2002): Beurteilung der Angiogenese und Osteogenese unter dem Einfluss von Vascular endothelial growth factor (VEGF). *Mund Kiefer Gesichtschir* 6, 175-182
- Krause D, Fackler M, Civin C, May WS (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13
- Kroll J, Waltenberger J (2000): [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol* 89, 206-218
- Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004): Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *J Orthop Res* 22, 544-551
- Kruyt MC, Dhert WJ, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2007): Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterials* 28, 1798-1805
- Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UM (2008): Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein - 2: radiographic observations. *Clin Oral Implan Res* 19, 1027-1033
- Liebschner MA (2004): Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 25, 1697-1714
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60

- Murakami N, Saito N, Horiuchi H, Okada T, Nozaki K, Takaoka K (2002): Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein - 2 (rhBMP - 2) and a synthetic polymer. *J Biomed Mater Res* 62, 169-174
- Murota SI, Onodera M, Morita I (2000): Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann N Y Acad Sci* 902, 208-213
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1135
- Nunamaker D (1998): Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop* 355, S56-S65
- Peroulis I, Jonas N, Saleh M (2002): Antiangiogenic activity of endostatin inhibits C6 glioma growth. *Int J Cancer* 97, 839-845
- Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N (1990): Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127, 965-967
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006): Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54, 385-395
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001): Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 19, 1029-1034
- Risau W (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674
- Sato K, Urist MR (1985): Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop* 197, 301-311
- Schiebler TH, Korf H-W: *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, 10. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2007
- 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, Weich H, Schulz J, Gruber R (2007): In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *J Biomed Mater Res Part A* 83, 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, Strecker N, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D (2012): Angiogenic functionalisation of titanium surfaces using nano-anchored VEGF—an in vitro study. *Eur Cells Mater* 23, 161-169
- Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel C, Pape H (2009): Tissue Engineering von Knochengewebe. *Unfallchirurg* 112, 785-795
- Schratt H-E, Spyra J (1997): Experimentelle Untersuchungen zur Einheilung und Antigenität von sterilisierten Knochentransplantaten. *Chirurg* 68, 77-83
- Senger DR, Van De Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo K-T, Yeo T-K, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993): Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12, 303-324
- Simonds R, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA (1992): Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *New Engl J Med* 326, 726-732
- Sirgi KE, Wick MR, Swanson PE (1993): B72. 3 and CD34 Immunoreactivity in Malignant Epithelioid Soft Tissue Tumors: Adjuncts in the Recognition of Endothelial Neoplasms. *Am J Surg Path* 17, 179-185
- Street J, Bao M, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N (2002): Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9656-9661
- Turgeman G, Zilberman Y, Zhou S, Kelly P, Moutsatsos IK, Kharode YP, Borella LE, Bex FJ, Komm BS, Bodine PV (2002): Systemically administered rhBMP - 2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem* 86, 461-474
- 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 (1997): Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res* 12, 343-346

Weber F, Eyrich G, Grätz K, Maly F, Sailer H (2002): Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly (lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 60-65

Weidner N (1995): Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 147, 9

Weihe S, Rasche C, Schiller C, Wehmöller M, Böckmann R, Eufinger H, Epple M (2004): Individuelle Implantate aus biodegradierbarem Kompositmaterial zur Versorgung von Schädeldefekten. *Materwiss Werksttech* 35, 224-228

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

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993): flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-498

Yang S, Leong K-F, Du Z, Chua C-K (2001): The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 7, 679-689

Lebenslauf

Am 15.11.1986 wurde ich, Florian Bernd Obermeyer, als Sohn von Monika Obermeyer geb. Preis und Dr. med. dent. Bernd Obermeyer in Bad Wildungen geboren.

Aufgewachsen bin ich in Alt Wildungen und besuchte dort von 1993-1996 die örtliche Grundschule. Die Hochschulreife erlangte ich im Juni 2006 am Gustav-Stresemann-Gymnasium in Bad Wildungen.

Zum Wintersemester 2006 begann ich mein Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg, wechselte zum Sommersemester 2008 an die Georg-August-Universität Göttingen und begann dort mein Zahnmedizinstudium. Im Dezember 2013 absolvierte ich mit Erfolg mein Staatsexamen Zahnmedizin und erhielt im Februar 2014 meine Approbation als Zahnarzt. Im April 2014 begann ich meine berufliche Tätigkeit als Vorbereitungsassistent in der Gemeinschaftspraxis Dr. Bernd und Monika Obermeyer in Bad Wildungen. Von Januar 2015 bis Dezember desselben Jahres arbeitete ich in der Gemeinschaftspraxis Michael Peschke und Guillermo Valencia in Kaufungen. Im Januar 2016 begann ich meine Tätigkeit als Weiterbildungsassistent für Oralchirurgie in der MGK-Klinik PD. Dr. med. Dr. med. dent. Arwed Ludwig in Kassel. Seit Januar 2017 führe ich meine Weiterbildung zum Oralchirurgen in der MKG-Praxis Dr. Dr. Thomas Reidick und Martin Seibel in Kassel fort.