

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

---

Einfluss der kombinierten Freisetzung von rhBMP-2 und  
rhVEGF165 aus PDLLA/Calciumcarbonat-Gerüsten auf die  
In-vitro-Aktivität der Osteogenese und Angiogenese

*INAUGURAL-DISSERTATION*

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

vorgelegt von

Johanna Margaretha Boven

aus

Haselünne

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: 11.06.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss der kombinierten Freisetzung von rhBMP-2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Calciumcarbonat-Gerüsten auf die In-vitro-Aktivität der Osteogenese und Angiogenese" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Knochen	2
1.1.1	Anatomie	2
1.1.2	Zelltypen	3
1.1.3	Extrazellulärmatrix	5
1.2	Knochenersatzmaterialien	6
1.2.1	Prozess der Knochenregeneration nach Implantation	8
1.2.1.1	Erste Phase: Hämostase	9
1.2.1.2	Zweite Phase: Inflammation	9
1.2.1.3	Dritte Phase: Proliferation	10
1.2.1.4	Vierte Phase: Modelling	11
1.2.2	Einteilung der Knochenersatzmaterialien	12
1.2.2.1	Anorganische Knochenersatzmaterialien	12
1.2.2.1.1	Metalle	12
1.2.2.1.2	Natürlichen Ursprungs	14
1.2.2.1.3	Synthetischen Ursprungs	16
1.2.2.1.4	Biogläser	17
1.2.2.2	Organische Knochenersatzmaterialien	18
1.2.2.2.1	Natürlichen Ursprungs	18
1.2.2.2.2	Synthetischen Ursprungs	21
1.3	Wachstumsfaktoren	24
1.3.1	PDGF	25
1.3.2	bFGF	25
1.3.3	IGF	26
1.3.4	TGF- $\beta$	26
1.3.5	BMP	27
1.3.6	VEGF	28
1.4	Probleme und Zielsetzung	29
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	Geräte und Laborausstattung	31
2.2	Zellen	32
2.3	Reagenzien und Lösungen	32
2.3.1	Beladen der Implantate	32
2.3.2	Zellkultur	32
2.3.3	Biochemische Auswertung	33
2.4	Software	33
2.5	Sterilbedingungen	33
2.6	Herstellung der Implantate	33

2.6.1	Gefriertrocknung .....	34
2.6.2	Begasungsprozess.....	36
2.7	Bestimmung der Wachstumsfaktorfreisetzung.....	37
2.7.1	Vorbehandlung der Zellkulturplatten.....	37
2.7.2	Vorbereitung der Medien.....	37
2.7.3	Releaseversuch .....	38
2.7.4	BMP-2-Elisa .....	39
2.7.5	VEGF- Elisa .....	41
2.8	Zellkultur .....	42
2.8.1	C2C12.....	42
2.8.1.1	Kultivierung.....	42
2.8.1.2	Mediumwechsel.....	42
2.8.1.3	Subkultivierung .....	43
2.8.1.4	Zellzahlbestimmung mittels CASY .....	43
2.8.1.5	Alkalische Phosphatase.....	44
2.8.1.6	BCA- Assay .....	44
2.8.2	HUVEC .....	45
2.8.2.1	Kultivierung.....	45
2.8.2.2	Mediumwechsel.....	46
2.8.2.3	Subkultivierung .....	46
2.8.2.4	Proliferationsassay .....	47
2.9	Statistische Auswertung .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1	Wachstumsfaktorfreisetzung .....	49
3.1.1	rhBMP-2-Release.....	49
3.1.2	rhBMP-2-Release der Kombinationsimplantate .....	51
3.1.3	rhVEGF <sub>165</sub> -Release .....	53
3.1.4	rhVEGF <sub>165</sub> -Release der Kombinationsimplantate .....	55
3.2	Biologische Aktivität .....	58
3.2.1	Alkalische Phosphatase .....	58
3.2.1.1	rhBMP-2-Implantate.....	58
3.2.1.2	Kombinationsimplantate.....	59
3.2.2	HUVEC-Proliferation .....	61
3.2.2.1	rhVEGF <sub>165</sub> -Implantate .....	61
3.2.2.2	Kombinationsimplantate.....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1	Diskussion der Methode .....	63
4.1.1	Trägermaterial.....	63
4.1.2	Wachstumsfaktoren.....	65
4.2	Bewertung der Ergebnisse .....	68

4.3	Ausblick.....	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	91
7.2	Tabellenverzeichnis.....	91
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	92
7.4	Lösungen und Chemikalien.....	94
7.5	Rohdaten .....	95

# 1 Einleitung

Ausgedehnte Knochendefekte können die Folge komplizierter Knochenfrakturen, Infektionen des Knochengewebes, kongenitaler Fehlbildungen oder durch die operative Entfernung benigner oder maligner Knochentumoren begründet sein (RUEGER 1998). Diese Defekte können die Selbstheilungskapazität des Knochens überfordern und stellen Probleme für die rekonstruktive Chirurgie dar. Zur Überbrückung größerer Knochendefekte wird der Einsatz von Transplantaten beziehungsweise Knochenersatzmaterial notwendig (SCHNUERER et al. 2003), da sonst erhebliche Wundheilungsstörungen die Folge sein können. Heute gilt nach wie vor das autogene Knochentransplantat als „Goldstandard“ (FRIEDLAENDER 1987; GARG 2006b), da es jedes der auf dem Markt vorhandene, zugelassene Knochenersatzmaterial an positiven Eigenschaften übertrifft (MISCH 2010).

Dennoch führt die hierfür notwendige Knochenentnahme zu erhöhter Morbidität des Patienten (FERNYHOUGH et al. 1992; KURZ et al. 1989; SCHAAF et al. 2010; YOUNGER und CHAPMAN 1989) sowie das limitierte Knochenangebot dazu, dass ein ständiges Bestreben nach geeigneten Alternativen, die der möglichst vollständigen Wiederherstellung dienen, stark vorangetrieben wird (EPPL 2001). Des Weiteren soll durch den Einsatz von Knochenersatzmaterialien die Regeneration des ortsständigen Knochens beschleunigt werden, sodass außerdem eine Entlastung des Patienten durch eine kürzere Genesungszeit die Folge ist.

Im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich erhält zusätzlich der ästhetische Gesichtspunkt und damit der psychosoziale Zustand des Patienten besondere Aufmerksamkeit, da dieser ebenso durch eine schnellere Wundheilung positiv beeinflusst werden könnte.

Aktuell wird der Einsatz osteogener Wachstumsfaktoren zur Förderung der körpereigenen Knochenregeneration diskutiert. Eine Gruppe der wichtigsten Faktoren hierfür sind die *Bone Morphogenetic Proteins* (TERMAAT et al. 2005). Außerdem wird als wichtigster Kofaktor der Regeneration von Knochen die Angiogenese angesehen (GERBER et al. 1999; STREET et al. 2002), sodass der Einsatz der Kombination von gefäßneubildungsfördernden und knochenneubildungsfördernden Substanzen den Effekt der einzelnen Substanzen potenzieren könnte (GERSTENFELD et al. 2003; HUANG et al. 2005; YH KIM und TABATA 2015). Entwicklungen dieser Art ermöglichen eine schnellere Rekonvaleszenzzeit für den Patienten, geringere Morbidität und verringern folglich die Kosten für das Gesundheitssystem (LIEBERMAN et al. 2002). Ziel dabei ist es, dem biologischen Vorbild im Freisetzungsmuster und in der Freisetzungsmenge nahezukommen (SCHLIEPHAKE 2010).

Die große Bandbreite an Forschungsansätzen unterstreicht, dass bis heute kein ideales Material gefunden wurde, welches allen Anforderungen gerecht wird. Der klinische Einsatz ist somit noch sehr beschränkt (LIEBERMAN et al. 2002; TSCHAKALOFF et al. 2000).

Aktuelle Knochenersatzmaterialien, welche zusätzlich die Funktion als Träger biologisch aktiver Substanzen besitzen, benötigen das Beladen mit Wachstumsfaktoren weit über das physiologische Maß hinaus (BODEN et al. 2000). Da die Herstellung der rekombinanten Faktoren sehr teuer ist und die unphysiologisch hohe Bereitstellung der Faktoren im Gewebe zu abakteriellen Entzündungen *et cetera* führen könnte, liegt das Hauptaugenmerk auf der Optimierung der langsamen, gleichmäßigen und physiologischen Freisetzung durch vorhandene Trägermaterialien (BHAKTA et al. 2013; BROWN et al. 2011). Aufgrund dessen werden vorhandene Lösungsansätze wie in der hier vorliegenden Arbeit weiter optimiert, um dem natürlichen Vorbild näher zu kommen.

## 1.1 Knochen

### 1.1.1 Anatomie

Knochengewebe stellt eine spezialisierte Form des Bindegewebes dar. Als Organ dient es dem Körper als Stütze, Mineraldepot, besitzt eine Schutzfunktion und spielt eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese (BARTL und BARTL 2011). Im menschlichen Organismus lässt sich makroskopisch Primärknochen (Geflechtknochen) von Sekundärknochen (Lamellenknochen) unterscheiden.

Primärknochen stellt sich als dreidimensionales Netzwerk aus Knochenbälkchen während der Knochenneubildung (Knochenentwicklung, Frakturheilung) dar. Dieser wird im Laufe der desmalen Knochenbildung durch Lamellenknochen ersetzt (JUNQUEIRA et al. 2005). Im Gegensatz zum Vorgang der desmalen Ossifikation findet bei der chondralen Ossifikation der Umbau eines zunächst knorpelig angelegten Skelettelements statt. Dieser komplexe Vorgang teilt sich auf in die perichondrale Ossifikation als ersten Schritt, und in der zweiten Phase findet die enchondrale Ossifikation statt (DELLER 2014).

Sekundärknochen setzt sich makroskopisch aus zwei Bauformen zusammen: der äußeren, kompakten Schicht (*Substantia compacta*) und einer inneren Schicht, die aus dem gitterartig aufgebauten Trabekelnetzwerk und dem Knochenmark besteht (*Substantia spongiosa*). Kompaktaknochen weist eine regelmäßige Ausrichtung der Kollagenfasern auf. Diese bilden etwa 5 - 20 konzentrische Lamellen um einen zentralen Kanal (Havers-Kanal, Zentralkanal), der das Havers-Gefäß enthält. Die Einheit aus Havers-Kanal und umgebenden Lamellen wird als Osteon oder Havers-System bezeichnet. Osteone verlaufen in Längsrichtung des Knochens. Die Zentralkanäle sind untereinander durch



querverlaufende Volkmann-Kanäle verbunden (MÜLLER 1924). So stehen Osteone, Endost, Knochenmark und Periost untereinander in Verbindung (LÜLLMANN-RAUCH 2012).

Die Poren der Spongiosa sind untereinander verbunden und mit Knochenmark (*Medulla ossium*) aufgefüllt. Es werden zwei Arten unterschieden. Einerseits rotes Knochenmark, welches an der Produktion von Blutzellen beteiligt ist und eine Reserve für mesenchymale Stammzellen darstellt (GARG 2006a). Diese Reserve wird im Erwachsenenalter vor allem in den Markräumen der Diaphysen fortschreitend durch gelbes Fettmark ersetzt (W SCHMIDT 2014).

Alle Knochenkompartimente sind von spezialisierten Häutchen umhüllt. Die Außenfläche des Knochens ist mit Ausnahme der Gelenkflächen von Periost bedeckt, welches eine Grenze zwischen dem Hartgewebe und dem umgebenden Weichgewebe bildet. Es besteht aus drei Schichten von spezialisiertem Bindegewebe: Die äußere gefäßreiche Adventitia, deren Gefäße die Volkmann- und Havers-Kanäle sowie das Knochenmark versorgen. Einer mittleren fibrösen Schicht, bestehend hauptsächlich aus dichten Kollagenfasern und elastischen Fasern. Diese Fibroelastika sorgt für die Reißfestigkeit, während die innere zelluläre Schicht (Kambiumschicht) im Direktkontakt mit dem Knochen steht und drei Zelltypen enthält: mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und spindelförmige Präosteoblasten (DELLER 2014).

Die Markhöhlen und Markräume sind durch Endost ausgekleidet. Dieses Endost ähnelt in seiner Architektur der Kambiumschicht des Periostes, weil in ihr ebenfalls Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten enthalten sind (GARG 2006a).

### 1.1.2 Zelltypen

Histologisch lassen sich spezialisierte Zelltypen unterscheiden: Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und *Bone Lining*-Zellen (MANOLAGAS 2000; SCHMIDMAIER und WILDEMANN 2006).

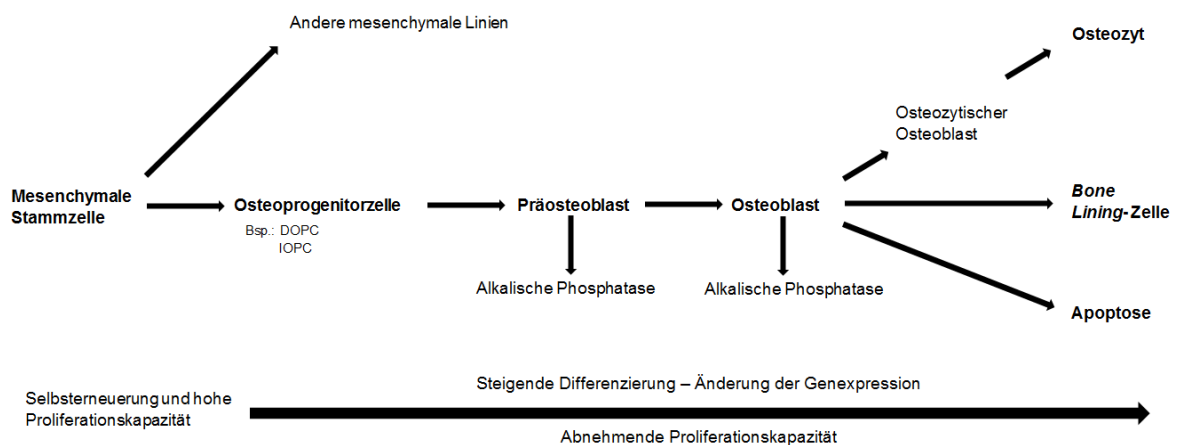
Osteoprogenitorzellen entwickeln sich aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen und gelten über die weitere Vorstufe der Präosteoblasten als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Diese sind durch die fortlaufende Differenzierung die Voraussetzung für die Fähigkeit des Knochens zur Regeneration und werden in determinierte Osteoprogenitorzellen (*Determined Osteogenetic Precursor Cell* = DOPC) und in induzierbare Osteoprogenitorzellen (*Inducible Osteogenetic Precursor Cell* = IOPC) als ubiquitär im Körper vorhandene Mesenchymzellen eingeteilt (FRIEDENSTEIN 1973, 1976).

Die hauptsächlich im Periost und den enossalen Oberflächen des Knochenmarks befindlichen DOPC stellen das Stammzellreservoir zur Bereitstellung von Präosteoblasten dar, welche den Bedarf für das Skelettwachstum und physiologischen Knochenumbau

decken. Eine besondere Rolle hierbei spielen die Wachstumsfaktoren (Mitogene) insbesondere *Insulin- Like Growth Factor-1* und 2 (IGF-1, IGF-2), *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *Platelet- Derived Growth Factor* (PDGF), *acidic und basic Fibroblast Growth Factor* (aFGF, bFGF) (TESCHNER und KÜSSWETTER 1999).

Die meist im Muskelgewebe und in den Faszien ansässigen IOPC sind anfangs undifferenziert und verhalten sich wie Bindegewebszellen. Sie besitzen jedoch die Fähigkeit, sich auf einen Stimulus hin einer chondroosteogenen Differenzierung zu unterziehen (KOCH et al. 2006). Hierbei scheinen vor allem osteoinduktive Faktoren an initialen Schritten der Differenzierung verantwortlich zu sein (REDDI et al. 1987), insbesondere die *Bone Morphogenetic Proteins-2, 3, 7 und 9* (BMP-2, BMP-3, BMP-7, BMP-9) (TESCHNER und KÜSSWETTER 1999).

Außerdem stehen je nach Lokalisation der heterotrophen Ossifikation perivaskuläre Fibroblasten, Endothelzellen der Gefäße und Perizyten zur Diskussion, sich auf bestimmte Stimuli hin zu Osteoprogenitorzellen zu differenzieren (BRIGHTON und HUNT 1991; KOCH et al. 2006; SCHOR et al. 1995).



**Abbildung 1: Schematischer Ablauf der osteogenen Differenzierung.**

**Vereinfachte Darstellung einzelner Entwicklungsstadien mit entsprechender Markerexpression der osteogenen Differenzierung ausgehend von einer mesenchymalen Stammzelle. Die Darstellung ist modifiziert nach Aubin (AUBIN 2001), S. 83).**

Osteoblasten säumen die Oberfläche der Knochenbälkchen und stellen sich als immobile, matrixbildende, stoffwechselaktive Zellen dar. Sie sezernieren die Bestandteile der Knochengrundsubstanz wie Kollagen, Proteoglykane und Markergene in den interstitiellen Raum (BLAIR et al. 2002). Sie produzieren während der Osteogenese außerdem Wachstumsfaktoren, die nach Sekretion die Fähigkeit besitzen, sowohl para- als auch autokrin stimulieren zu können. Zur Kommunikation, welche für die Knochenformation notwendig ist, stehen die Osteoblasten über feine zytoplasmatische Fortsätze und *Gap Junctions* mit ihren Nachbarzellen in Verbindung (SIMS und GOOI 2008; STAINS und

CIVITELLI 2005). Der größte Teil der Osteoblasten unterliegt der Apoptose (JILKA et al. 1998).

Zu Osteozyten reifen etwa 10 - 20% der Osteoblasten, die in Lakunen der Matrix eingelagert sind. Auch sie bilden in Kanalikuli verlaufende Fortsätze mit benachbarten Osteozyten aus, die über *Gap Junctions* verbunden sind. So wird ein über die verknöcherte Grundsubstanz hinweg ausgedehntes Netzwerk geschaffen, wodurch ein Stoffaustausch untereinander und durch die Verbindung zu den Kanälen des Osteons auch mit den übrigen Knochenzellen möglich ist (NOBLE 2008).

*Bone Lining*-Zellen (Knochendeckzellen) sind stark abgeflachte, ruhende, ebenfalls terminal differenzierte Osteoblasten, welche die Knochenoberfläche umgeben (DELLER 2014; PARFITT 1994). Ihre genaue Funktion ist nicht abschließend erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass diese Zellen eine Rolle in den Abbauprozessen des Knochens einnehmen. Sie locken Vorläuferzellen der Osteoklasten über Signalproteine an und sezernieren Kollagenase, welche die intakte Matrix für die Aufgaben der Osteoklasten vorbereitet (PARFITT et al. 1996).

Osteoklasten unterscheiden sich bezüglich ihres Ursprungs von den übrigen Knochenzellen und entstehen aus mononukleären hämatopoetischen Stammzellen (ROODMAN 1996). Es sind für den Knochenabbau und seine Resorption zuständige, mehrkernige Riesenzellen (MANOLAGAS 2000).

### 1.1.3 Extrazellulärmatrix

Die beschriebenen zellulären Bestandteile des Knochengewebes sind in eine extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet. Diese besteht zu etwa 35% aus einem organischen und zu etwa 65% aus einem anorganischen Anteil (QUELCH et al. 1983). Die organische Matrix besteht zu etwa 85 - 90% aus miteinander verknüpften Kollagenfasern überwiegend des Typ I (BATGE et al. 1992). Außerdem finden sich in Osteozytenlakunen geringfügige Mengen Kollagen des Typs II, III und V (TRIFFITT 1987). Die organische Matrix stellt einen Speicher für biologische Signalmoleküle dar, die im Falle eines Geweberemodelling freigesetzt werden (MOHAN und BAYLINK 1991). Diese wurden während der Osteogenese durch Osteoblasten sezerniert und in die Knochenmatrix eingebaut, beispielsweise TGF- $\beta$ , BMP und PDGF (GARG 2006a). Des Weiteren lassen sich Knochenproteine, die während der Reifung der Matrix und des Differenzierungsprozesses der Osteoblasten exprimiert werden, in der Knochenmatrix finden (DELLER 2014). Dazu gehört zu Beginn der Reifung die transient erscheinende alkalische Phosphatase, zeitlich folgt Osteokalzin, Osteopontin, während Osteonektin ein sicheres Kennzeichen für reife Osteoblasten ist und zeitlich der Phase der Mineralisierung der Matrix zuzuordnen ist (OWEN et al. 1990).

Die anorganische Phase der Matrix besteht aus im Kollagengeflecht eingelagerten Hydroxylapatitkristallen ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) (DELLER 2014).

## 1.2 Knochenersatzmaterialien

Die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien bezieht sich auf die basalen Prinzipien der Biologie sowie die spezifischen Anforderungen der Gewebe, welche ersetzt werden sollen.

Ziel ist es, in den Modelling-, Remodelling- oder Heilungsprozess des Knochens eingebunden zu werden, um das Knochenwachstum zu unterstützen oder dieses in den Gebieten zu stimulieren, wo Resorptionen aufgetreten sind. Idealerweise wird dies durch die Unterstützung der drei bei der knöchernen Regeneration zentralen Mechanismen erreicht:

- Osteogenese,
- Osteoinduktion und
- Osteokonduktion (BRUDER und FOX 1999).

Osteogene Knochenersatzmaterialien sind mit Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen besiedelt und besitzen die Fähigkeit der osteoblastenvermittelten Neossifikation. Osteoinduktive Materialien sind durch Beladung mit Signalmolekülen zur Stimulation der Prozesse, die der Osteogenese zugrundeliegen, befähigt (KUEBLER 1997). Knochenersatzmaterialien sind zudem begrenzt selbst in der Lage, die Osteoinduktion zu fördern (BARRADAS et al. 2011). Der Osteokonduktion liegt zugrunde, dass eingebrachte Implantate die Aufgabe einer Leitschiene übernehmen und damit eine dreidimensionale Struktur vorgeben, an der die ortsständigen osteokompetenten Zellen anlagern beziehungsweise einwachsen können. Die responsiven Zellen des Stützgewebes gehören einem adhäsionsabhängigen Zelltypus an, sodass Knochen nur appositionell auf existierenden Oberflächen wächst (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001; TESCHNER und KÜSSWETTER 1999). Diese Eigenschaft sollte folglich eine der Grundvoraussetzungen bilden. Derartige rein osteokonduktive Knochenersatzmaterialien sind in der Lage, die Knochenregeneration zwar zu fördern, jedoch ist die Heilung bei Defekten ab einer bestimmten Größe insuffizient (HSIONG und MOONEY 2006). Aufgrund dessen sollten Ersatzmaterialien idealerweise alle der drei genannten Eigenschaften besitzen. Die meisten bis heute angewandten Strategien zur Wiederherstellung nutzen jedoch lediglich zwei der basalen Komponenten.

Im Fall dieser Dissertation wird Knochenersatzmaterial entwickelt, welches die osteokonduktiven mit osteoinduktiven Eigenschaften verbindet (SCHLIEPHAKE et al. 2015). Es handelt sich dabei um osteokonduktives Knochenersatzmaterial, welches um

die Eigenschaft eines sogenannten *Drug-Delivery-Systems*, also der Freisetzung biologisch aktiver Cytokine, erweitert wurde.

Potentiell lassen sich alle der vorhandenen Biomaterialien als Träger für Wachstumsfaktoren mit Einschränkungen nutzen. Es sollte jedoch die Freisetzungskinetik dem Muster der natürlichen Freisetzung annähernd entsprechen, sowie in der freigesetzten Menge dem physiologischen Vorbild ähneln. Derartige biomimetische Modifikationen der Knochenersatzmaterialien im Sinne einer Biofunktionalisierung könnten zu einer verbesserten Einheilung, unter anderem durch die Aktivierung der Osteo- und Angiogenese, führen. Aktuell werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, welche stark von den Materialeigenschaften des Trägers abhängen. Der eine Ansatz bezieht sich auf eine Biofunktionalisierung der Oberfläche des Materials, welche insbesondere bei nicht degradierbaren Trägermaterialien von Bedeutung ist. Der Andere beschäftigt sich mit der Inkorporierung aktiver Moleküle in das Material selbst und findet Anwendung bei resorbierbaren Materialien.

Für ein ideales Knochenersatzmaterial sollten spezifische Anforderungen gelten (EPPLE 2003a): Sie müssen im vitalen Milieu ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften aufrechterhalten ohne zelluläre Toxizität zu induzieren, systemische Effekte zu bewirken, immunologische Abstoßungsreaktionen hervorzurufen oder mutagene Nebenwirkungen zu verursachen (MURRAY et al. 2007; WILLIAMS 2008). Darüber hinaus sollte das Knochenersatzmaterial mechanisch belastbar, in Form und Größe flexibel, frei verfügbar, sterilisierbar, lagerfähig und günstig in der Herstellung sein (BESSA et al. 2008). Die ausreichende Stabilität ist erforderlich, um knöchernen Defekte überbrücken zu können und dem Einwachsen der umgebenden Weichgewebe standhalten zu können.

Wünschenswert wäre zudem, auf einen zweiten chirurgischen Explantationseingriff verzichten zu können oder es gibt es den Fall, dass während der Wachstumsphase verloren gegangene oder nicht angelegte Knochensubstanz ersetzt werden muss. Letzteres verbietet sogar das Implantieren starrer Ersatzmaterialien und es muss eine Alternative verfügbar sein (WEIHE und EPPLE 2001).

Man unterscheidet aus diesem Grund Biomaterialien in biostabile und abbaubare Materialien. Resorbierbare Materialien haben Vorteile, jedoch gelten zusätzlich charakteristische Anforderungen. Die Resorbierbarkeit des Materials sollte mit der Geschwindigkeit der knöchernen Durchbauung korrelieren ohne dabei mit dem physiologischen Heilungsverlauf zu interferieren sowie den neu gebildeten Knochen stützen, bis dieser belastbar ist. Des Weiteren sollte es eine poröse Struktur mit idealerweise interkonnektierenden Poren aufweisen (KARAGEORGIU und KAPLAN 2005), welche das Einwachsen kleinster Blutgefäße zulassen, sodass die implantierten Zellen versorgt werden oder im Fall eines *Drug-Delivery-Systems* die eingebrachten

biologischen Signale das Einwachsen undifferenzierter Zellen durch einen chemotaktischen Gradienten fördern (MAYER et al. 2009). Die Porengröße resorbierbarer Materialien sollte einen kritischen Durchmesser von 100 µm nicht unterschreiten und liegt idealerweise bei etwa 200 - 400 µm, da so den einsprossenden Osteonen zur Durchwachsung genug Raum geboten werden kann (KARAGEORGIOU und KAPLAN 2005; KLAWITTER und HULBERT 1971). Größere Poren reduzieren zudem die mechanische Stabilität, verringern die spezifische Oberfläche und sind daher unvorteilhaft.

Beispielhaft für poröses resorbierbares Knochenersatzmaterial ist die neue Klasse der regenerativen Biomaterialien, deren Zweck es ist, eine Geweberegeneration durch Degradation einzuleiten, um im Verlauf des Regenerationsprozesses durch *de novo* synthetisierte extrazelluläre Matrixbestandteile und später ausgereiften Lamellenknochen ersetzt zu werden (HEINEMANN et al. 2011; SCHLIEPHAKE 2010).

### 1.2.1 Prozess der Knochenregeneration nach Implantation

Die Entnahme von Knochenteilen mit nachfolgender Implantation unterschiedlichster Ersatzmaterialien in der rekonstruktiven Chirurgie führt zu einer Zusammenhangstrennung mit entsprechenden Folgen wie lokaler Gewebetraumatisierung und der operationsbedingten Unterbrechung der Mikrozirkulation. Dies gilt ebenso beim Wiederaufbau fehlender Knochensubstanz. Alle Stützgewebe sind zur organotypischen Regeneration befähigt, d.h. zerstörte Zellen werden durch morphologisch und funktionell gleichwertige Zellen ersetzt. Ist nach Abschluss der Wachstumsvorgänge die Integrität des Gewebes wiederhergestellt, spricht man von einer Regeneration oder *restitutio ad integrum* (BRAUN und RÜTER 1996).

Gleichen die nachwachsenden Zellen den verlorengegangenen Zellen weder funktionell noch strukturell, entsteht ein minderwertiges Gewebe. Dieser Vorgang wird als Reparatur bezeichnet. Übersteigt das lokale Trauma die Selbstheilungskraft des Körpers (*critical size defect*), ist mit einer Heilung im Sinne einer Reparatur zu rechnen. Um diesem Prozess entgegenwirken zu können, kommen in der Wiederherstellungschirurgie immer öfter Ersatzmaterialien zum Einsatz.

Die Implantateinheilung oder Geweberegeneration nach Implantation ist ein komplexer und hoch organisierter Prozess und kann grundsätzlich in vier Phasen eingeteilt werden: Hämostase, Entzündung, Proliferation und Remodelling (SILVER und CHRISTIANSEN 1999). Es sind verschiedene Begriffsdefinitionen der einzelnen Phasen beschrieben worden (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001; DAVIES 2003; GARG 2006a; MARX und GARG 1998).

### 1.2.1.1 Erste Phase: Hämostase

Ein lokales Knochen trauma kann viele Ursachen haben und ist unvermeidbar mit dem Zerreißen der ortsständigen Blutgefäße verbunden (WE ROBERTS 1988). Innerhalb von Sekunden beziehungsweise Minuten wird der Defekt mit einströmendem Blut aufgefüllt. Ionen und Serumproteine wie Albumin, Fibrinogen und Fibronectin adhären auch an der Implantatoberfläche (BAGAMBISA et al. 1994). Diese Hämokompatibilität hängt sehr stark von der Oberflächengüte, der Benetzbarkeit und Oberflächenenergie des eingebrachten Implantats ab und ist eine der wichtigsten Voraussetzungen, dass Zellen an der Oberfläche anheften können und sich so ein Gewebekontakt mit der Materialoberfläche etablieren kann. Im Wundraum vernetzen sich Fibrinmonomere unter Einfluss von Thrombin sowie dem fibrinstabilisierenden Faktor (Gerinnungsfaktor XIII) und bilden ein Fibrinnetzwerk aus (HOTH und WISCHMEYER 2012; SHAH-DERLER et al. 2009). Dieses stellt eine provisorische Matrix als wichtige Grundlage für die spätere Knochenheilung dar (DAVIES 2003). Durch Kontakt der Thrombozyten zu Kollagen, der Implantatoberfläche oder anderen Signalen des Gewebedefekts setzen diese unterschiedliche Botenstoffe zur Zell- Zell- Kommunikation frei (LIND 1996). Die Thrombozyten aggregieren und verschließen die Blutgefäßruptur.

### 1.2.1.2 Zweite Phase: Inflammation

Im ersten Schritt der zweiten Phase erhöhen unter anderem Bradykinin, Histamin und Thrombin der Thrombozyten die Blutgefäßpermeabilität, sodass die Endothelzellen langsam auseinanderdriften (SUKRITI et al. 2014). Vaskuläre Endothelzellen kleiden die Innenwände der Blutgefäße aus, besitzen Barrierefunktion, rekrutieren Gefäßzellen und organisieren die Angiogenese. Ihre Funktionen werden über Botenstoffe, wie zum Beispiel PDGF, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und TGF- $\beta$  reguliert (SATO 2001). Auf der Innenseite der Gefäßwände begünstigt das Auseinanderdriften die Adhäsion und Diapedese von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNM) aus dem Blutkreislauf, die durch die freigesetzten Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin und Interleukin angelockt werden. PNM haben einen segmentierten Kern und bewegen sich, nachdem sie die Basallamina durchdrungen haben, amöboid entlang eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten in hypoxische Bereiche. Sie eliminieren durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies u.a. orale Bakterien, die nach dem Eingriff in der Wunde verblieben sind und setzen proteolytische Enzyme, wie Kollagenase und Elastase, frei. Außerdem locken sie durch Freisetzen von MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Protein-1*) Makrophagen an, die ihrerseits durch Phagozytose kleine Knochenspäne sowie zerstörte körpereigene Zellen biochemisch degradieren (RE SCHMIDT 2000). Diese Makrophagen synthetisieren proinflammatorische Zytokine sowie Proteasen und dominieren die späte Entzündungsphase, in der sie beginnen endogene

Inhibitoren gegen die Verdauungsproteasen (TIMP, *Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase*) der PMN zu synthetisieren. Dieser Mechanismus bewahrt die Matrixproteine und Proteoglykane in der Wunde vor weiterem Abbau. Wachstumsfaktoren und *Messenger-Proteine* wie VEGF, PDGF und FGF (*Fibroblast Growth Factor*), welche Fibroblasten sowie die Angiogenese stimulieren, initiieren die Proliferationsphase (BOLANDER 1992).

### **1.2.1.3 Dritte Phase: Proliferation**

Etwa ab dem dritten Tag migrieren Fibroblasten amöboid in die Wunde und sezernieren die protektierenden und stabilisierenden Komponenten der Matrix wie Kollagen, Elastan und Proteoglykane. Die niedrige Sauerstoffkonzentration im Gewebe beeinflusst die Proliferationsrate von Makrophagen und Endothelzellen und stimuliert diese, den Transkriptionsfaktor *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) zu bilden (HONG et al. 2014). Daraufhin wird VEGF gebildet, der die perivaskulären Zellen stimuliert, sich in Osteoblasten und Fibroblasten zu differenzieren (HIRSCHI et al. 2002; NISSEN et al. 1998). Perizyten sind den glatten Muskelzellen ähnlich und über Fokalkontakte mit den Endothelzellen verbunden. Sie regulieren die Angiogenese indem sie entlang des VEGF-Gradienten in Bereiche mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck migrieren um dort neue Gefäße zu bilden, die im Verlauf an das vorhandene Gefäßnetz angeschlossen werden. Die Angiogenese stellt die Sauerstoffversorgung wieder her und bildet so die Grundlage für die Knochenheilung. Etwa ab dem siebten Tag haften aktivierte Osteoklasten an der versehrten Knochenoberfläche und resorbieren die vorhandene Knochenmatrix, sodass die in der Knochenmatrix gespeicherten Wachstumsfaktoren wie BMP, TGF- $\beta$ , FGF, IGF und PDGF freigesetzt werden, was wiederum die Knochenbildung initiiert (LIND 1996; MOHAN und BAYLINK 1991). Perivaskuläre Zellen formen nicht nur neue Blutgefäße, sondern sie migrieren an das verbliebene Trabekelwerk und an die Implantatoberfläche, wo sie sich unter dem Einfluss von BMP, welches außerdem von Zellen des Periosts freigesetzt wird, zu Osteoblasten differenzieren (GERSTENFELD et al. 2003). Die bereits an der Implantatoberfläche adsorbierten Proteine, wie zum Beispiel Fibronectin, haben einen entscheidenden Einfluss auf das Anheften der Osteoblastenvorläuferzellen. Die mitogene und morphogene Wirkung des *Transforming Growth Factor-beta* und der *Bone Morphogenetic Proteins* auf Fibroblasten sowie Osteoblasten bewirken während der ersten drei bis sieben Tage die Expression von extrazellulärer Matrix und Knochenmatrixproteinen. Hierbei werden in der Proliferationsphase als wesentliche Bestandteile der Knochenmatrix, Kollagen I, II, IV, IX, X freigesetzt. Nach der Wiederherstellung der Perfusion steigert sich deren Produktion, sodass sich individuelle Osteoidinseln bilden können (GARG 2006a). In den folgenden Wochen verbindet diese biochemische und zelluläre Phase der Knochenregeneration die einzelnen bereits gebildeten Osteoidinseln, um das Implantat klinisch zu konsolidieren. Dieser Prozess



nutzt das in der ersten Phase gebildete Fibrinnetzwerk als Gerüst, um darauf aufzubauen. Man bezeichnet diesen Vorgang als Osteokonduktion (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001). Exprimierte osteogene Signalstoffe wie Osteokalzin, Osteonectin, Osteopontin, alkalische Phosphatase und *Bone-* Sialoprotein induzieren die weitere Ausreifung der extrazellulären Matrixkomponenten durch Mineralisation zu einer Knochenmatrix (SCHULTZE- MOSGAU 2007). Es bildet sich im Verlauf Geflechtknochen mit irregulärer Mikroarchitektur. Im Fall resorbierbarer Implantate schreitet das Einwachsen von Knochen in das Implantatinnere mit gleichzeitiger Resorption des Implantatkörpers vor. Der körperliche Zerfall (Volumendegradation S. 21) der Implantate sollte idealerweise mit dem Zeitpunkt der knöchernen Durchwachsung mit Geflechtknochen korrelieren.

#### **1.2.1.4 Vierte Phase: Modelling**

Dieser Prozess findet Wochen nach der Operation statt und wird auch osteoadaptive Phase der Osseointegration genannt. Diese Phase beschreibt den Umbau des gering adaptierten Geflechtknochens in weniger zellulären, aber besser mineralisierten und höher strukturierten Knochen (GARG 2006a). Dies wird durch das Zusammenwirken von Osteoblasten und Osteoklasten gewährleistet (MARX und GARG 1998). Die Aufgaben beider Zellen werden weitestgehend über die Osteozyten und ihre Signalproteine, wie beispielsweise Sclerosin, koordiniert. Osteoklasten, die unter anderem durch das neu gebildete Kapillarnetzwerk an den Ort der Regeneration gelangen, initiieren durch die Resorption des in Phase drei gebildeten Knochens die Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren. Stammzellen in lokalen Geweben und im Gefäßsystem antworten durch Differenzierung zu Osteoblasten und Neubildung von Knochen (LIND 1996). Dieser Prozess der Stimulation und Migration mesenchymaler Stammzellen aus der Oberfläche des ortständigen periimplantären Knochengewebes und deren Differenzierung zu knochenkompetenten Zellen wird als Osteoinduktion bezeichnet (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001). Da dieser üblicherweise während bereits einwirkender Kräfte gebildet wird, richtet sich der durch Osteoblasten neu gebildete hoch strukturierte Lamellenknochen anhand des Lastprofils aus (DAVIES 2003). Regelrechtes und koordiniertes Knochenmodellierung unterhält die Stabilität des Implantats im Fall nicht resorbierbarer Implantate. Am Ende ergibt sich ein leistungsstarkes Netzwerk aus trabekulärem Knochen, welches optimal an die Lastsituation angepasst ist.

## 1.2.2 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

Die Unmengen an vorhandenen Materialien lassen sich in organische und anorganische Materialien unterteilen (SCHLIEPHAKE 2010).

**Tabelle 1: Übersicht und Einteilung ausgewählter Knochenersatzmaterialien.**

Eigene Darstellung nach Schliephake (SCHLIEPHAKE 2010).

Anorganische KEM		Organische KEM		
Metalle	Mineralisierte Träger		Natürliche Polymere	Synthetische Polymere
	natürlichen Ursprungs	synthetischen Ursprungs		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Titan</li> <li>• Eisenbasislegierungen</li> <li>• Cobalt-Chrom-Legierungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Korallen</li> <li>• Algen</li> <li>• Xenogen:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Boviner-/Equiner Knochen</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hydroxylapatit (HA)</li> <li>• Tricalciumphosphat (TCP)</li> <li>• Bioaktive Gläser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kollagen</li> <li>• Chitosan</li> <li>• Seide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>u. a.:</li> <li>• PLA</li> <li>• PGA</li> </ul>

### 1.2.2.1 Anorganische Knochenersatzmaterialien

#### 1.2.2.1.1 Metalle

Unter den metallischen Werkstoffen gelten Titan und seine Legierungen als die am besten geeigneten Materialien für medizinische Anwendungen, weil sie die komplexen Werkstoffanforderungen im physiologischen Kontext besser erfüllen als viele andere konkurrierende Werkstoffe, wie beispielsweise Eisenbasislegierungen, Cobalt-Chrom-Legierungen oder andere Edelmetalllegierungen (STEINEMANN 1998).

Die vorteilhaften Eigenschaften von Titan sind unbegrenzte Verfügbarkeit, hohe Festigkeit bei geringer Dichte, eine überlegene Korrosionsbeständigkeit, sowie chemische und biologische Inertheit (WILLIAMS 1977a, 1977b). Diese ist darauf zurückzuführen, dass Titan spontan eine dünne, zusammenhängende Oxidschicht (ca. 3 - 7 nm) ausbildet, welche passivierend wirkt (STEINEMANN 1998). Aufgrund des basischen Charakters des Metalloxids ermöglicht es die chemische Adsorption von Molekülen mit sauren Eigenschaften. Des Weiteren lassen sich im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie geometrisch sehr komplexe und präzise Implantate gestalten (WEIHE und EPPLE 2001).

Nachteilig ist im Gegensatz dazu beispielsweise eine erhöhte Temperaturempfindlichkeit der Patienten nach Implantation ausgedehnter Titankonstruktionen im Bereich der Schädelkalotte sowie das für einige Patienten belastende Gefühl eines im Organismus verbleibenden Fremdkörpers. Die Anwendung im nicht ausgewachsenen Skelett ist zudem nur innerhalb sehr enger Grenzen möglich (WEIHE und EPPLE 2001). Außerdem ist es möglich, dass die Passivierungsschicht beispielsweise durch Überbelastung zerstört wird, sodass Korrosionsprodukte oder Partikel in das umgebende Gewebe freigesetzt

werden, die Entzündungsreaktionen auslösen können und zudem zytotoxische Wirkung haben.

Seit einiger Zeit werden zunehmend Methoden zur Oberflächenmodifizierung erarbeitet, um die Osseointegration zu verbessern. Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Einstellung spezieller Rauigkeiten, Erhöhung der Benetzbarkeit, Beeinflussung elektrostatischer Ladungen und dem Aufbringen von Hydroxylapatitschichten. Zusätzlich wird intensiv daran gearbeitet, osteoinduktive Eigenschaften an Titanimplantaten zu etablieren (LE GUEHENNEC et al. 2007). Da die Umstände und Temperaturen, unter denen anorganische Träger produziert werden, generell ein Beladen bioaktiver Moleküle in das Material selbst ausschließen, können derartige anorganische Träger nur in Erwägung gezogen werden, um an ihrer Oberfläche über Bindung aktiver Moleküle biofunktionalisiert zu werden (SCHLIEPHAKE et al. 2012).

Chemische Modifikationen der Oberfläche sind die wohl am vielversprechendsten Versuche, um Gewebeintegration und periimplantäre Gewebereaktionen zu verbessern. Damit soll der kritische Prozess der zellulären Anheftung verkürzt oder maßgeschneidert an den spezifischen Bedarf des Gewebes angepasst werden. Der am wenigsten komplexe Weg, Wachstumsfaktoren an der Oberfläche anorganischer Materialien zu binden, ist die Adsorption, das heißt die Anreicherung von Molekülen aus Flüssigkeiten an der Oberfläche eines Festkörpers. Dieses ist beispielsweise während des Eintauchens des Festkörpers in eine Lösung mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor möglich. Die adsorptive Bindung kann in Form von Physisorption oder Chemisorption stattfinden (SCHLIEPHAKE 2010).

Physisorption beruht auf der Tatsache, dass anorganische Materialoberflächen negativ geladen sind und positiv geladene Proteine, wie Strukturproteine oder Gerüsteiweißstoffe (Bsp. Kollagen) durch physikalische Kräfte daran binden können. Bei dieser Art der Bindung verändert das gebundene Molekül seine Struktur nicht, jedoch ist die Bindung so schwach, dass derart beladene Implantate innerhalb der ersten Stunde nahezu vollständig im Sinne eines *Burst Release* den beladenen Faktor freisetzen (HALL et al. 2007; NH KIM et al. 2015).

Die Chemisorption ist im Unterschied zur Physisorption nicht immer reversibel, da das Adsorbat beziehungsweise das Adsorbens chemisch verändert werden kann. Nachteilig bei beiden Bindungsarten ist, dass bei dem notwendigen Vorgang der Sterilisation die biologisch aktive Oberfläche zerstört wird.

Deshalb wurden für diese Anwendung Bindungsmoleküle entwickelt, die eine Beladung mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor nach dem Sterilisationsprozess möglich machen. Beispielsweise werden Phosphatanker, Thiolanker, mit Phosphatankern konjugierte RDG-Peptide oder alternativ nicht-codierte Oligonukleotide benutzt, um etwa

BMP-2 an die Oberfläche zu binden (SCHLIEPHAKE et al. 2012). Chemisorptives Verbinden von BMP wurde mit einer verzögerten Freisetzung von der Oberfläche beschrieben und verbessert die Knochenheilung in signifikanter Weise (ADDEN et al. 2006).

Der Nachteil der fehlenden Biodegradierbarkeit von Metallen wird durch neuere Forschungsansätze widerlegt. Jene beziehen sich auf resorbierbare Metallimplantate auf der Basis von Eisen/Edelstahl-Legierungen (FRATTOLIN et al. 2015). Diese können in Abhängigkeit von der Legierungszusammensetzung durch Korrosion biodegradiert werden. Ebenfalls wird seit Jahren an biodegradierbaren Metallimplantaten auf Magnesiumbasis geforscht (Y CHEN et al. 2014; WITTE 2015). Bis heute sind jedoch keine kommerziellen Produkte verfügbar, jedoch gibt es in Zukunft eventuell die Möglichkeit, von dieser Art der Metallimplantate im klinischen Alltag profitieren zu können (HEINEMANN et al. 2011).

#### *1.2.2.1.2 Natürlichen Ursprungs*

Anorganische mineralisierte Träger können einerseits in solche, die von natürlichen Vorläufern abstammen oder andererseits auf synthetische Art hergestellt worden sind, eingeteilt werden.

Poröses Hydroxylapatit gilt derzeit in der praktischen Anwendung als bevorzugtes Biomaterial, da es sich in Abhängigkeit vom Porositätsgrad, der Kristallinität, dem Kristallgefüge etc. als nahezu resorptionsstabiles Material etabliert hat. Es stellt eine vorteilhafte interkonnektierende offene Porenstruktur bereit.

Die anorganischen Knochenersatzmaterialien natürlichen Ursprungs können aus unterschiedlichen Spezies gewonnen werden. Verwendet werden Materialien, welche aus Korallen oder Algen gewonnen wurden. Alternativ zählen auch die Knochenersatzmaterialien bovinen oder equinen Ursprungs in diese Kategorie. Entscheidend für die mechanische Stabilität, Oberflächeneigenschaften, Porosität und Kristallitgröße sind hier vor allem die Brennbedingungen (KASPERK et al. 1988).

Bovine Xenotransplantate gehören zu der allgemein bekanntesten und am häufigsten verwendeten Quelle der natürlichen Knochenersatzmaterialien (RENTSCH et al. 2012). Sie werden zur Gruppe der hochkristallinen Hydroxylapatit-Keramiken gezählt. Es handelt sich um überwiegend durch chemische und thermische Prozesse deproteinisierten spongiösen Knochen. Durch die nach den Hochtemperatur-Brennprozessen erhaltene interkonnektierende offene Porenstruktur erfolgt ausgehend vom ortständigen Transplantatlager die angiogenetische Erschließung und sukzessive knöcherne Durchbauung (KLEIN et al. 2010). Es handelt sich folglich um ein osteokonduktives Knochenersatzmaterial. Da das Material nicht resorbiert wird, es jedoch unter klinischen Bedingungen zu einer vollständigen Regeneration kommt, wird diese Art auch als

biokompatibles Füllmaterial bezeichnet (AYNA et al. 2015; TRAINI et al. 2007). Prominenter Vertreter dieser Gruppe, besonders bei kleineren Knochendefekten des Mund-Kiefer-Gesichtsbereichs, ist Bio-Oss® (Fa. Geistlich Biomaterials, Baden Baden). Es konnte gezeigt werden, dass sich bei vertikalem Knochenaufbau eines atrophischen Kiefers mit diesem Knochenersatzmaterial histomorphometrisch und histologisch in Bezug auf Prothesen-Defekte, Peri-Implantat-Defekte und bei biologischen sowie prothetischen Komplikationen genauso gute Ergebnisse erzielen lassen wie mit autologem Knochen, bei gleichzeitig geringerer Invasivität (FELICE et al. 2009). Um einer möglichen Gefahr der Übertragung von beispielsweise BSE (boviner spongiformer Enzephalopathie), also der möglichen Kontamination pharmazeutischer Produkte boviner Herkunft aus dem Weg zu gehen, stellten einige Hersteller die Produkte auf equine Herkunft um.

Eine andere Herkunft bieten Meereskorallen. Abhängig von der Art der Vorbehandlung wird aus den Korallen resorbierbares Calciumcarbonat oder resorbierbares poröses Hydroxylapatit hergestellt. Es zeigten sich in klinischen Studien gute Eigenschaften bei der Versorgung von segmentalen Knochendefekten (NASR et al. 1999; OREAMUNO et al. 1990). Es bietet eine Matrix für das Einwachsen von Knochen, ist demnach *per se* ein rein osteokonduktives Knochenersatzmaterial. Trotz der genannten positiven Eigenschaften ist es vor allem aufgrund der geringen mechanischen Stabilität und einer nur sehr langsam stattfindenden Resorption nur begrenzt klinisch einsetzbar (DAMIEN und REVELL 2004).

Des Weiteren können marine Kalkalgen durch chemische Prozesse zu Hydroxylapatit umgewandelt werden. Es bleibt das poröse Algenskelett als Calciumphosphat erhalten. Mit interkonnektierender Mikroporosität dient es ebenfalls als Leitschiene für Osteoblasten. Wie bei den anderen calciumhaltigen Keramiken kommt es im ersten Schritt zur partiellen An- oder Auflösung der Keramik bei Gewebekontakt. Die lokale Übersättigung des Blutserums hinsichtlich der Ausfällung von Apatit führt zur Keimbildung an der Oberfläche und zur lokalen Ausfällung von Mikrokristallen bestehend aus nichtstöchiometrischem Apatit. Durch Ansiedlung von Osteoblasten erfolgt die Produktion der extrazellulären Matrix, in der die Apatitkristalle inkorporiert werden (EPPL 2003b).

Viele weitere xenogene Produkte sind auf dem Markt erhältlich und unterscheiden sich von den ausführlich erwähnten Produkten in der Herkunft (Schwein oder Pferd) oder in Bezug auf das Herstellungsverfahren (Lösungsmittelkonservierung oder Sinterung).

Die Lagerung in Knochenbanken und die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit gehören zu den Vorteilen dieser Art von Knochenersatzmaterialien. Da es sich jedoch grundsätzlich um körperfremdes biologisches Material handelt, kann die Gefahr von Infektionen und immunologischen Reaktionen praktisch nicht ausgeschlossen werden (WENZ et al. 2001). Diese Art der Materialien muss aufwendigen Reinigungsverfahren unterzogen werden, um

eine mögliche Übertragung von Infektionen zu vermeiden sowie fehlende genetische Kompatibilität zwischen Spender- und Empfängergewebe auszugleichen (ENDRES et al. 2005; FRIEDLAENDER et al. 1976).

Neuere Versuchsansätze haben das Ziel, die oben vorgestellten biokompatiblen und osteokonduktiven Knochenersatzmittel durch Kombination mit biologischen Wirkstoffen weiter zu verbessern. Die trivialste Lösung, entsprechende Materialien um die Eigenschaft der Osteoinduktivität zu erweitern, ist das Tränken des Materials in Eigenblut oder *Platelet-Rich Plasma* (PRP). Spezifischer ist der Einsatz selektiver, meist rekombinant hergestellter Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP (EPPEL 2003b). Die Beladung von Bio Oss® mit rhBMP-2 führt zu signifikant besseren Ergebnissen als die der Kontrollgruppen (HUH et al. 2015).

#### 1.2.2.1.3 Synthetischen Ursprungs

Hinsichtlich Verfügbarkeit und eventueller Risiken der Materialien natürlichen Ursprungs wurden vollsynthetische Knochenersatzmaterialien entwickelt (HOFFMANN et al. 2001). In Betracht kommen vor allem Calciumphosphatpräparate, deren Vorteil eine dem Knochen sehr ähnliche mineralische Phase ist. Diese sind durch Brenn- und Fällungsprozesse herstellbar, um danach durch Sintern oder Heißpressverfahren in Form gebracht zu werden. Es ist möglich, sie in exakt definierbaren physio- und kristallchemischen Eigenschaften herzustellen, sodass bei gleich bleibender Chargenqualität eine besser abschätzbare biologische Reaktionsweise ermöglicht werden kann. Auch weisen sie ein Gerüst aus interkonnektierenden Poren mit spezifischer Oberflächengröße auf (WEIBRICH et al. 2000).

Knochengewebe hat ein Calcium-Phosphat-Verhältnis (Ca/P-Ratio) von etwa 2,3, wobei es interindividuelle Abweichungen gibt (TZAPHLIDOU und ZAICHICK 2003). Entsprechend dem Verhältnis von Calcium zu Phosphat kann man die Werkstoffklasse der Calciumphosphate nach ihrer stöchiometrischen Zusammensetzung einteilen:

- Tricalciumphosphat (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) hat ein stöchiometrisches Verhältnis von Calcium zu Phosphat von 1,5. Es kommt in der  $\alpha$ - und in der  $\beta$ - Modifikation vor, wobei die  $\alpha$ - Form durch Erhitzen auf mehr als 1125 °C aus der  $\beta$ - Form entsteht. Diese unterscheiden sich in der Kristallform und ihrer Löslichkeit (WILTFANG et al. 2002).
- Hydroxylapatit (HA oder HAP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) ist Hauptbestandteil der Mineralphase des Knochens und zeichnet sich durch eine Zusammensetzung von Calcium zu Phosphat von 1,67,
- Octacalciumphosphat ( $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,33 und
- Tetracalciumphosphat (TTCP,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ) mit einer Ca/P-Ratio von 2,0 aus.

Allgemein gilt, je kleiner das Ca/P-Verhältnis, desto höher ist die Wasserlöslichkeit des Calciumphosphats. Die meisten sind also nur wenig löslich in neutralem Wasser, wohingegen alle säurelöslich sind. Alle Calciumphosphate sind im reinen Zustand weiße Festkörper (EPPL 2003a). Sie besitzen eine gute Druckfestigkeit, zeigen jedoch Schwächen bei Zug- sowie Stoßbeanspruchung (DE GROOT 1988; MOORE et al. 2001). Klinisch am weitesten verbreitet sind Calciumphosphatkeramiken aus Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat. Beide weisen sehr gute Bioverträglichkeit auf und zeichnen sich durch einen direkten Verbund der Keramik mit dem umgebenden Knochengewebe aus (GÜNTHER et al. 1993; JARCHO et al. 1977; KÖSTER et al. 1976; SINIKOVIC et al. 2007). Aus implantologischer Sicht verhalten sich Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat osteokonduktiv. Zusätzlich lassen sie ein osteoinduktives oder osteogenes Verhalten vermissen (SIEBERT et al. 1986). Ein Durchwachsen des porösen Calciumphosphatgerüsts und damit eine vollständige Durchbauung der primär avitalen Matrix bleiben im klinischen Einsatz aus (ROONEY et al. 1988; SIEBERT et al. 1986). Des Weiteren konnte bisher keine sichere Vorhersage über die Degradationsrate im menschlichen Knochen getroffen werden (DE LONG et al. 2007). Es besteht die Gefahr, dass die Resorption des Ersatzmaterials entweder zu einem Zeitpunkt stattfindet, zu dem noch nicht genügend neues Knochenvolumen vorhanden ist, oder es resorbiert zu langsam (HOLLINGER et al. 1996). Die relativ geringe mechanische Stabilität und die unzureichende ossäre Integration führten zu einer abnehmenden Akzeptanz, sodass es heutzutage nur wenige Indikationen für den Einsatz von synthetisch hergestelltem Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat als Knochenersatzmaterial vor allem in lasttragenden Gebieten gibt (STUETZLE et al. 1998).

Durch eine Kombination von Tricalciumphosphat mit Kollagenen, nicht kollagenen Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren kann die knöcherne Integration des Materials jedoch verbessert werden (SEEHERMAN et al. 2004).

#### 1.2.2.1.4 Biogläser

Eine weitere Gruppe anorganischer nichtmetallischer Werkstoffe sind Biogläser, die erstmals 1969 vorgestellt wurden (HENCH 2006). Hier handelt es sich um hochvernetzte röntgenamorphe Werkstoffe, die in der Regel aus 40 - 50% SiO<sub>2</sub>, 10 - 15% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 30 - 35% CaO, 5 - 10% Na<sub>2</sub>O, 0,5 - 3% K<sub>2</sub>O und 2,5 - 5% MgO bestehen (EPPL 2003a). Es ist jedoch eine Vielzahl von Kombinationen realisierbar, die sich in Biokompatibilität und Resorbierbarkeit unterscheiden. Bei hohem SiO<sub>2</sub>-Gehalt sinkt die Biodegradierbarkeit bei Biogläsern, bei hohem Calcium- und Phosphatgehalten steigt sie. Biogläser weisen eine poröse Oberfläche auf und sind sowohl in kompakter als auch partikulierter Form erhältlich (EL-GHANNAM et al. 1995). Das Oberflächenrelief sorgt für einen guten knöchernen Einbau (*bony ongrowth*) des Materials, da jedoch die innere Struktur kein

interkonnektierendes Porensystem aufweist, ist die knöcherne Durchbauung (*bony ingrowth*) nur sehr schwach ausgeprägt (GARG 2006b). Das Material ändert bei Kontakt mit Blut durch Ausbildung einer Doppelschicht von Silizium-Gel und Calciumphosphat seine Oberflächeneigenschaften (HENCH und PASCHALL 1974). Kollagen und Proteine aus der Umgebung des Knochens werden inkorporiert und vermitteln eine direkte chemische Bindung (HENCH und WILSON 1984). Es wird angenommen, dass die beschriebene Eigenschaft einen fördernden Effekt auf die Apatitnukleation hat und folglich die Knochenbildung beschleunigt (JELL und STEVENS 2006; MOORE et al. 2001).

Nachteile der Biogläser sind vor allem die geringen mechanischen Eigenschaften sowie die geringe Bruchzähigkeit aufgrund des amorphen Netzwerks. Die Biegefestigkeit der meisten Biogläser liegt im Bereich von 40 bis 60 MPa, der für die meisten lasttragenden Anwendungen nicht ausreichend ist (HA und WINTERMANTEL 2009). Ebenfalls ist die mechanische Bearbeitung aufgrund der hohen Rissanfälligkeit stark eingeschränkt. Durch eine Wärmebehandlung könnten geeignete Glaszusammensetzungen in Glas-Kristall-Komposite überführt werden, wodurch sich die mechanischen Eigenschaften positiv manipulieren und verändern könnten (HEINEMANN et al. 2011).

### **1.2.2.2 Organische Knochenersatzmaterialien**

Ersatzmaterialien organischen Ursprungs zeichnen sich vor allem durch ihre Biokompatibilität, ihre Resorbierbarkeit und ihre Bioaktivität aus (X LIU und MA 2004). Die Degradation kann durch körpereigene Prozesse ohne toxische Nebenprodukte stattfinden. Durch chemische oder physikalische Verfahren kann die Struktur der Polymere modifiziert werden, um sie an die biologischen Voraussetzungen exakt anzupassen. Wie anorganische Träger können organische Träger in solche, die von natürlichen Vorläufern abstammen und andere, die aus rein synthetischen Polymeren hergestellt werden, unterteilt werden (REZWAN et al. 2006). Es kommen natürliche Polymere aus Kollagen, Chitosan oder Seide in Frage oder jene synthetischen, die aus Derivaten der Polyglykolsäure oder -laktidsäure hergestellt werden können (SCHLIEPHAKE 2010). Weil organische Trägermaterialien das Entwickeln von Materialzusammensetzungen und -oberflächenbeschaffenheiten in Verbindung mit Proteinen eines größeren Ausmaßes ermöglichen, ist es wahrscheinlich, dass diese ein höheres Potential besitzen, eine gezielte Freisetzungskinetik in Bezug auf die Anwendung als Trägermaterial bereitzustellen.

#### *1.2.2.2.1 Natürlichen Ursprungs*

Kollagen als Knochenersatzmaterial ist eines der am häufigsten verwendeten Materialien natürlichen Ursprungs. Es sind biochemisch und strukturell 19 unterschiedliche Typen humanen Kollagens bekannt, von denen zwölf gut charakterisiert sind. Es erfolgt eine



Einteilung der Kollagene in sieben Hauptgruppen: die fibrillären (Typ I, II, III, V, XI), die fibrillen-assoziierten (Typ IX und XII), die mikrofibrillären (Typ IV und VII), die Basallamina-Kollagene (Typ IV), die Kurzketten-Kollagene (Typ VIII und X), die transmembranösen (Typ XIII und XVII) und die Multiplexin-Kollagene (Typ XV und XVIII) (DRENCKHAHN 2008). Zur Rekonstruktion knöcherner Defekte kam bisher Kollagen Typ I, das in Fibrillen des lockeren und straffen Bindegewebes des Knochens vorkommt, zum Einsatz (FRIESS 1998). Gewonnen wird es vor allem aus Haut oder Sehnen von Schlachttieren und liegt dann in löslicher oder fibrillärer Form vor (WAHL und CZERNUSZKA 2006). Es steht abhängig von der Art der medizinischen Anwendung in Form von Gel, Pulver, Film, Fasern, Schaum oder als Lösung zur Verfügung (HA et al. 2009). Die Sterilisation erfolgt durch  $\gamma$ -Bestrahlung, da die meisten anderen Methoden sich als nicht praktikabel in Bezug auf die physikalischen und biologischen Fähigkeiten herausgestellt haben (FRIESS 1998). Kollagenimplantate gelten als biokompatibel, nur schwach immunogen und werden In-vivo auf physiologischem Weg metabolisiert (CHVAPIL 1977; RUBIN et al. 1969). Ihr Abbau erfolgt enzymatisch durch Kollagenasen und ist zeitlich abhängig von der Wahl des Implantattyps. Kollagen moduliert unter anderem das Haftungsvermögen von Zellen und kann das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung positiv beeinflussen (MIZUNO et al. 1997; SUMITA et al. 2006).

Unter den Trägermaterialien natürlichen Ursprungs hat Kollagen die breiteste Anwendung für die Freisetzung biologisch aktiver Moleküle. Die Potenz wurde mehrfach belegt (AROSARENA und COLLINS 2005; ULUDAG et al. 2000). Außerdem ist es das einzige Material, das bis jetzt eine US FDA-Genehmigung (*Food and Drug Administration*, USA) als Trägermaterial für BMP besitzt. Dieses Material hat jedoch als Kollagenschwamm nur sehr schlechte Eigenschaften in der Freisetzungskinetik (BOERCKEL et al. 2011; ULUDAG et al. 1999). Daher wurden chemische Veränderungen der Kollagenfibrillen entwickelt, die besser an den Wachstumsfaktor binden sollen und ihn folglich nur verzögert freisetzen. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass Kollagen viele Heparinbindungsstellen aufweist und gleichzeitig Wachstumsfaktoren an Heparin binden können (SCHLIEPHAKE 2010). Dieser Versuch wurde mit der Bindung von VEGF bereits erfolgreich durchgeführt (STEFFENS et al. 2004; YAO et al. 2006). Weitere chemische Modifikationen durch Verbinden einer N-terminalen Domäne des Kollagens an einen Wachstumsfaktor (BMP-2) werden erforscht. Dieser Ansatz soll die knöcherne Heilung in *Critical Size*-Defekten verbessern (B CHEN et al. 2007). Der Einsatz von Kollagenschwämmen als Trägermaterial wird jedoch ebenfalls durch ihre geringen mechanischen Eigenschaften limitiert. Eingesetzt werden Schwämme daher überwiegend in unbelasteten Defekten oder als Komposit mit anderen Ersatzmaterialien (CUNNIFFE et al. 2010). Ferner besteht bei der Anwendung von Kollagen die Gefahr einer Auto-

immunreaktion, die aufgrund einer Sensibilisierungsreaktion gegen eigenes Kollagen entstehen kann (X LIU und MA 2004). So scheint Kollagen nicht das ideale Trägermaterial für BMP-2 Moleküle darzustellen (LIEBERMAN et al. 2002).

Ein weiterer organischer Träger natürlichen Ursprungs ist die Seidenfaser, die aus zwei Arten von Protein besteht: aus Fibroin und Sericin, welches das Fibroin umhüllt. Abhängig von der jeweiligen Quelle, Seidenraupe oder Spinne, gibt es Unterschiede bezüglich des Aufbaus, der Struktur und der Eigenschaften (ALTMAN et al. 2003). Seide der Seidenraupe zeigte sich immunogen (DEWAIR et al. 1985). Die Entfernung des klebstoffähnlichen Sericin, das als Bindungsmittel für die Fibroinstränge der natürlichen Seide wirkt, hat zu einem biokompatiblen Material geführt (SANTIN et al. 1999; SOFIA et al. 2001). Das Fibroin-Protein kann als Gel, Folie, Schaum oder Fäden bis hin zu Netzen für unterschiedliche Anwendungen zur Verfügung stehen (MEINEL und KAPLAN 2012). Die Degradation erfolgt nur sehr langsam. Da es sich um ein Protein handelt, erfolgt diese proteolytisch. Charakteristisch sind die hohe Beanspruchbarkeit, sowie die zahlreichen Möglichkeiten, Seide zu modifizieren. Forschungsgruppen fanden heraus, dass Seide ohne Modifikation bei der Anwendung am Schafsmodell keine herausragenderen Ergebnisse als Knochenersatzmaterial zeigt. Eine mögliche Erklärung könnte das Fehlen einer interkonnektierenden porösen Struktur sein, sodass ein Durchwachsen mit neu gebildetem Knochen nur eingeschränkt möglich ist (UEBERSAX et al. 2013). Das Verbinden mit aktiven Molekülen wie RDG-Peptide, Parathormon oder *Bone Morphogenetic Protein-2* ist beispielsweise über die NHS/EDC-Chemie möglich (MIN et al. 2004). Diese Art führte zu einer längeren Bindung des Faktors am Material sowie zu einer erhöhten Mineralisation In-vitro (KARAGEORGIU et al. 2004). Releaseversuche mit IGF-I scheinen ebenfalls erfolgversprechende Ansätze zu bieten (WENK et al. 2008). In-vivo-Versuche mit adsorptiver Beladung des BMP-2 zeigten verbesserte Ergebnisse verglichen mit den Kontrollgruppen (KARAGEORGIU et al. 2006; KIRKER-HEAD et al. 2007).

Außerdem kann Chitin für die Herstellung von Knochenersatzmaterial genutzt werden. Chitin ist ein stickstoffhaltiges, lineares Polysaccharid. Es kommt als einer der Hauptbestandteile des Aussenskeletts von Gliederfüßlern vor. Nach Auslösung des Chitins werden durch Demineralisation die verbliebenen Proteine entfernt (HA et al. 2009). Anschließend erfolgt die Behandlung mit Natronlauge, sodass als Deacetylierungsprodukt Chitosan gewonnen werden kann (GLASMACHER et al. 2014). Einer der großen Vorteile ist der relativ geringe Kostenaufwand bei der Herstellung (VENKATESAN und KIM 2010). Des Weiteren verfügt es über hervorragende Biokompatibilität, stellt ein poröses Netzwerk zur Verfügung und wirkt selbst antibakteriell. Für den Einsatz als Knochenersatzmaterial wird es vor allem als Kompositmaterial

genutzt. Kombinationen mit Hydroxylapatit, Alginat, Calciumphosphat oder synthetischen Polymeren sind über verschiedene Herstellungswege möglich (DI MARTINO et al. 2005). Trotz einiger guter Eigenschaften sind die mechanischen Fähigkeiten dieser Komposite noch sehr stark limitiert (VENKATESAN und KIM 2010). Außerdem erlaubt Chitosan die Bindung von Wachstumsfaktoren über die maleimide Chemie der Glykosaminoglykole (DI MARTINO et al. 2005; SCHLIEPHAKE 2010). In-vitro-Versuche zeigten, dass Chitosan als Trägermaterial mit einer verzögerten Freisetzungskinetik im Vergleich zu adsorptiver Beladung wirksam ist (PARK et al. 2006). Spätere klinischen Studien bestätigten diese Ergebnisse allerdings nicht (ENGSTRAND et al. 2008).

#### *1.2.2.2 Synthetischen Ursprungs*

Die Mehrheit der organischen Materialien, die rein synthetischen Ursprungs sind, stellt die Gruppe der Poly- $\alpha$ -Hydroxysäuren dar: Polyglycolsäure (Polyglycolid, PGA) und Polymilchsäure (Polylactid, PLA) sowie deren Derivate (EPPLÉ 2003a). Synthetisch hergestellte Polymere verfügen über äußerst günstige Eigenschaften im Hinblick auf ihre Biokompatibilität und Biofunktionalität (KROEZE et al. 2009). Vorteile gegenüber den Produkten natürlichen Ursprungs ergeben sich aus der reproduzierbaren Herstellung unter kontrollierten Bedingungen sowie der Möglichkeit einer chemischen Modifizierung (GUNATILLAKE und ADHIKARI 2003). Chemisch lassen sich  $\alpha$ -Hydroxysäuren durch direkte Kondensation der Milch- und Glycolsäure zu niedermolekularen Poly- $\alpha$ -Hydroxysäuren mit geringen mechanischen Eigenschaften kondensieren. Die Depolymerisation findet in der Schmelze bei Temperaturen von 140 °C - 180 °C unter Abspaltung von Wasser zu den zyklischen Diestern Laktid beziehungsweise Glycolid statt. Durch eine katalytische Ringöffnung können aus den Dilaktonen die hochmolekularen Polyester Polylactid beziehungsweise Polyglycolid hergestellt werden (DITTRICH und SCHULZ 1971; HA et al. 2009; KLEINE und KLEINE 1959). Die Chiralität führt zu einer hohen Polarität entlang des Polymers, sodass es zu einem hohen Grad auskristallisieren kann. Dies verbessert die mechanischen Eigenschaften und macht sie sehr hydrolysestabil und damit nur langsam biodegradierbar (ANDERSSON et al. 2010). PLA besitzt eine zusätzliche Methylgruppe und ist hydrophober als PGA. Polylactid kommt aufgrund des chiralen Kohlenstoffatoms in zwei stereoisomeren Varianten vor: Poly-D-Milchsäure (PDDA) und Poly-L-Milchsäure (PLLA). Sie haben bis auf die Drehung des polarisierten Lichtes gleiche physikalische und chemische Eigenschaften. Außerdem existiert eine optisch inaktive stereoanisomere Form, die Poly-D,L-Milchsäure (PDLLA). Dieses Racemat ist im Vergleich zu den hochkristallinen Formen, aufgrund der hohen Unordnung durch die statistische Abfolge der D- und L-Monomere, eher weich, amorph und schneller biodegradierbar (EPPLÉ 2003a).

Der Abbau aliphatischer Polyester erfolgt durch hydrolytische Degradation in Form der umgekehrten Polykondensationsreaktion und erfolgt im wässrigen Milieu bis hin zum Polymerisationsausgangsprodukt (HA et al. 2009). Dieser Prozess ist nicht auf die Oberfläche beschränkt, sondern erfolgt im ganzen Volumen (Volumendegradation, *bulk degradation*), da die Diffusion von Wasser ins Innere der Polymere schneller ist als deren Hydrolyse. In-vivo erfolgt dieser in vier Phasen (KRONENTHAL 1975): die Wasseraufnahme bewirkt zunächst ein Auflösen sekundärer und tertiärer Strukturen. Dieser Vorgang der Hydratation bewirkt das Lösen der van der Waals'schen Kräfte sowie der Wasserstoffbrücken. Im zweiten Schritt erfolgt der Festigkeitsverlust durch initiale Spaltung der kovalenten Bindungen. Hierbei spielen die Eigenschaften der Polyester eine entscheidende Rolle. Abhängig von der Kristallinität, Hydrophilie, Oberflächenbeschaffenheit, Geometrie und Zusammensetzung des Polymers sowie von der Wasserverfügbarkeit, der Temperatur und des pH-Werts des Gewebes findet dieser Vorgang mit unterschiedlicher Geschwindigkeit statt. Das dritte Stadium ist gekennzeichnet durch fortschreitende Spaltung kovalenter Bindungen. Das Molekulargewicht kann den Massenzusammenhalt nicht mehr gewährleisten. Dies führt zum Formverlust. Die Auflösung niedermolekularer Verbindungen führt während der vierten Phase zum Massenverlust des Implantats (KRONENTHAL 1975). Grundsätzlich degradiert Polyglycolid schneller als Polylactid, da Ester primärer Alkohole aus sterischen Gründen reaktiver sind als die Ester sekundärer Alkohole. Grundsätzlich degradiert PGA schneller als PDLLA und PLLA im Vergleich noch langsamer (REZWAN et al. 2006), wobei sich eine zu lange Degradationszeit wiederum negativ auf die knöchernen Regeneration auswirkt (FERGUSON et al. 1987). Die Einstellung der exakt auf die Bedürfnisse der rekonstruktiven Chirurgie angepassten Degradationszeit stellt somit eine weitere wichtige Anforderung an die Entwicklungstechnik der Polymere.

Die Beteiligung von Enzymen am Abbau dieser Polymere In-vivo ist umstritten, in jedem Fall aber nicht erforderlich. Im Anfangsstadium der Degradation ist die Beteiligung von Enzymen jedenfalls unwahrscheinlich, da sie aufgrund ihrer Größe nicht in das Polymer eindiffundieren können. Die Degradation ohne großen zellulären Einfluss ist daher weniger stark vom Implantationsort und individuellen Patientenunterschieden abhängig, im Vergleich zu osteoklastären Resorption von beispielsweise Kollagenen (ZELLIN und LINDE 1997).

Ein Nachteil, welcher beim Abbau der Kunststoffe In-vivo entstehen kann, ist die Bildung einer fibrösen Kapsel um hochmolekulare Degradationsprodukte, die entstehen, wenn die Glasübergangstemperatur nahe der Körperkerntemperatur liegt. In diesem Fall können die Abbauprodukte weder hydrolysiert noch phagozytiert werden. Durch die Entwicklung

von Polymeren, deren Abbauprodukte eine Glasübergangstemperatur weit oberhalb der Körpertemperatur haben, lässt sich dieses Problem umgehen (REZWAN et al. 2006).

Ein weiteres Problem beim Einsatz dieser Polyester im Bereich der rekonstruktiven Chirurgie ist, dass die bei der Degradation freiwerdenden und sich möglicherweise ansammelnden Hydroxycarbonsäuren den pH-Wert negativ beeinflussen und zu einem lokal toxischen Milieu führen (BÖSTMAN et al. 1990). Die Kombination der Polymere mit amorphem carbonathaltigem Calciumphosphat (Carbonat-ACP) bewirkt eine bessere Abstimmbarkeit der Pufferungseigenschaften und die höhere Löslichkeit mit folglich besserer Bioresorbierbarkeit als die Kombination mit anderen Zusätzen (LINHART et al. 2001; SCHILLER und EPPLE 2003; WEIHE und EPPLE 2001). Mit steigendem Füllstoffgehalt wird das Material spröder, und seine Zugfestigkeit nimmt ab. Untersuchungen zur Biokompatibilität der in der Medizin gebräuchlichen Polymere konnten gute Eigenschaften im Sinne einer geringen Fremdkörperreaktion bestätigen (EUFINGER et al. 2007; HEIDEMANN et al. 2001; MARTIN et al. 1996).

Aufgrund der Thermolabilität der Trägermaterialien auf Polylactid- beziehungsweise Polyglycolid-Basis ergeben sich Schwierigkeiten bei der Sterilisierbarkeit. Zur Zeit scheint die  $\gamma$ -Bestrahlung die geeignetste Methode zu sein, um eine Keimfreiheit zu gewährleisten (ATHANASIOU et al. 1996).

Eines der Anwendungsgebiete resorbierbarer Polyester ist die Nutzung als Trägermaterial im Bereich der kontrollierten Freisetzung biologischer Signalstoffe (BABENSEE et al. 2000; HA et al. 2009). Mögliche Konzepte sehen hierbei vor, biodegradierbare aliphatische Polyester in einer geeigneten Weise mit einer aktiven Substanz zu beladen, sodass sie einerseits die Funktion eines Knochenersatzmaterials übernehmen, andererseits als Wirkstoffreservoir dienen können (RR CHEN und MOONEY 2003; SCHLIEPHAKE 2010). Das Ziel ist es, die Degradation des Polymers mit der Freisetzung des Wirkstoffs so zu koppeln, dass die Stützfunktion des Implantats für die Geweberegeneration als ausreichend angesehen wird, gleichzeitig aber über einen bestimmten Zeitraum stets eine therapeutisch optimale Wirkstoffkonzentration erreicht wird.

Für das Herstellen solch poröser Implantatkörper aus beispielsweise PDLLA gibt es eine Vielzahl möglicher Verfahren, wie beispielsweise das Pressverfahren und das Begasungsverfahren mit  $\text{CO}_2$  (WEIHE et al. 2001). Da das Pressverfahren Temperaturen von etwa 170 °C benötigt, kommt diese Art der Herstellung für das Herstellen von Implantaten, welche mit biologisch aktiven Substanzen beladen sind, nicht in Frage, da diese bei derart hohen Temperaturen denaturieren würden. Im Gegensatz dazu kann durch den Beladungsvorgang mit gelösten und rehydrylierten Wachstumsfaktoren im Verlauf des Begasungsverfahrens mit  $\text{CO}_2$  sogar eine gleichmäßige Verteilung aktiver

biologischer Substanzen im Implantatkörper erzielt werden (TSCHAKALOFF et al. 2000). Diese und weitere verfahrenstechnische Variationen ermöglichen das Herstellen vielversprechender Trägersubstanzen in Bezug auf Biokompatibilität und Biofunktionalität. Sie sind aufgrund dieser Erkenntnisse im Fokus der Forschung.

Es gibt weitere biodegradierbare Polymere wie Poly( $\epsilon$ -caprolacton), Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat), Poly( $p$ -dioxanon) und Polyanhydride (VERT et al. 1992). Jedoch existieren für diese aliphatischen Polyester bislang nur wenige klinische Erfahrungswerte.

### 1.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide zwischen 6 - 45 kDa und dienen als Signalmoleküle der zellulären Kommunikation. Ihre Funktionen variieren erheblich während der Embryogenese, des postnatalen Wachstums und des Erwachsenenalters. Während der Embryogenese sind sie mitverantwortlich für die Steuerung der Gliedmaßenbildung und Organogenese, wohingegen sich postnatal ihre Rolle auf die Geweberegeneration beschränkt (SCHLIEPHAKE 2002).

Ihre Wirkung wird In-vivo durch ein kompliziertes Rückkopplungssystem mit anderen Wachstumsfaktoren, Enzymen und Bindungsproteinen gesteuert.

Wachstumsfaktoren haben eine komplexe dreidimensionale Struktur, die es erlaubt, dass die Faktoren sich an spezifische Rezeptoren, in der Regel transmembranöse Proteine, binden können. Die Aktivierung kann autokrin, parakrin oder endokrin durch Bindung der biologisch aktiven Substanz an Rezeptoren stattfinden. Dieser Vorgang führt in der Regel zu einer Konformationsänderung. Folglich kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Phosphorylierungsenzyme, die eine intrazelluläre Signaltransduktionskette auslösen, indem sie die Aggregation von Kofaktoren und anderen Proteinen induzieren, welche zum Nukleus migrieren. Diese aktivieren mit anderen Transkriptionsfaktoren eine Reihe von Genen, sodass es zu einer Änderung der zellulären Aktivität oder des Phänotyps kommt. Der Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Zielzelle ist folglich mitogen oder morphogen.

Die therapeutische Anwendung dient dazu, den Heilungsprozess weit über das physiologische osteoregenerative Maß zu stimulieren (GARG 2006c). Sie führt dazu, dass Defekte, die spontan nicht heilen würden (*critical size defects*), ohne zusätzliche Gewebetransplantation verheilen. Da die Wachstumsfaktoren in der Regel eine kurze Halbwertszeit besitzen, können sie nicht direkt an die Defektstelle injiziert werden, sondern sollten über *Drug-Delivery*-Systeme, oder besser direkt mit dem Ersatzmaterial in notwendiger Konzentration und über einen angemessenen Zeitraum erhalten bleiben, um gewünschte Ergebnisse zu erzielen (RR CHEN und MOONEY 2003). Viele Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wurden bereits für vorklinische- und klinische Versuche benutzt. Diese meist rekombinanten Wachstumsfaktoren sind in ihrer Aminosäuresequenz

und ihrer 3-D-Struktur identisch im Vergleich zu humanen Wachstumsfaktoren. Sie werden beispielsweise von eukaryotischen Zellen oder Bakterien (*Escherichia coli*), die mit dem jeweiligen Gen transfiziert/ transduziert worden sind, gebildet (WOZNEY et al. 1988).

Die Mehrheit der in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendeten Wachstumsfaktoren ist darauf ausgerichtet, mesenchymales Gewebe zu regenerieren. Insbesondere die Knochenheilung liegt im Fokus der klinischen Untersuchungen (GERSTENFELD et al. 2003). Es gibt sechs Wachstumsfaktoren, die bei der Knochenheilung eine Rolle spielen und in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie in vielen Modellen bereits getestet wurden (BOLANDER 1992; LIND 1996):

- Platelet- Derived Growth Factor (PDGF)
- basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)
- Insulin- Like Growth Factor (IGF)
- Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ )
- Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

### 1.3.1 PDGF

*Platelet- Derived Growth Factor* (PDGF) ist ein dimeres Protein von 30 kDa mit zwei verschiedenen Peptidketten (A und B) welche die drei Isoformen des PDGF ausmachen: zwei homodimere Formen (PDGF AA und PDGF BB) und ein heterodimeres Protein (PDGF AB). PDGF AB und PDGF BB kommen systemisch in den Alpha- Granula der Thrombozyten vor (HART et al. 1990). Im Gegensatz dazu wird PDGF AA nur lokal von Osteoblasten sezerniert. Sie besitzen In-vivo neben einer chemotaktischen Wirkung auf Präosteoblasten, Osteoblasten und Fibroblasten auch einen proliferativen Effekt auf undifferenzierte Zellen mesenchymaler Herkunft (LIND 1996; MANNAIONI et al. 1997). Sie wirken somit überwiegend mitogen und stellen einen wichtigen Mediator für die Heilung und das Remodelling von Knochengewebe dar. In Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren kann PDGF die Knochenregeneration fördern, ohne selbst osteogene Eigenschaften zu besitzen (SCHLIEPHAKE 2002). PDGF wirkt als ein Schlüsselfaktor in der frühen Regenerationsphase mesenchymaler Gewebe.

### 1.3.2 bFGF

*Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF, FGF-2) ist ein Wachstumsfaktor, der durch Proliferation und Differenzierung verschiedener mesenchymaler Zelltypen die Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe unterstützt (GOSPODAROWICZ et al. 1987). Mittlerweile sind 23 verschiedene Polypeptide der Fibroblasten-Familie bekannt. Natürlich vorkommendes bFGF wird von Osteoblasten produziert, daraufhin durch den

Co-Liganden Heparansulfatproteoglykan gebunden und im Extrazellularraum gespeichert (MOHAN und BAYLINK 1991). Es verbessert durch wachstumssteigernde Effekte auf die meisten Fibroblastentypen die Vaskularisation im Knorpelgewebe und steigert auf diese Weise die Proliferation von Epithelzellen (GOSPODAROWICZ et al. 1987). FGF-2 wirkt folglich als ein Mediator in der frühen Phase der Knochenheilung, indem es Zellzahl und Vaskularisation verbessert, hat selbst jedoch keinen direkten morpho- oder mitogenetischen Effekt auf reife Osteoblasten (BIKFALVI et al. 1997). Die bFGF-medierte Signaltransduktion interagiert mit vielen anderen Wachstumsfaktor-Kaskaden und dient demnach als ein wichtiger Kofaktor in dem komplexen Prozess der knöchernen Regeneration.

### 1.3.3 IGF

*Insulin- Like Growth Factors* (IGFs) sind Einzelstrangmoleküle, von denen zwei Isoformen existieren (IGF-I und IGF-II), wobei die Konzentration von IGF-I etwa zehn- bis fünfzehnmal geringer ist als die von IGF-II (MOHAN und BAYLINK 1991). Im Gegensatz zu den anderen Faktoren, die mehr oder weniger auf lokaler Ebene eine Rolle spielen, wirkt IGF darüber hinaus systemisch (CANALIS 1985). Grundsätzlich fördern sie fötale und postnatale Wachstums- und Entwicklungsvorgänge, wirken auf lokaler Ebene als Überlebensfaktor und sichern den Erhalt der Knochensubstanz (SCHLIEPHAKE 2002). Durch Bindung an sechs verschiedene IGF-BPs (*Insulin- Like Growth Factor Binding Proteins*) wird die Aktivität und Verfügbarkeit reguliert. Ihre Wirkung wurde jedoch nur in wenigen klinischen Studien belegt, hier zumeist in Kombination mit PDGF (GARG 2006c).

### 1.3.4 TGF- $\beta$

*Transforming Growth Factor- $\beta$*  (Transforming Growth Factor-beta, TGF- $\beta$ ) gehört zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie, einer Familie von etwa 40 Proteinen, die auch die *Bone Morphogenetic Proteins* einschließen (AB ROBERTS 1998). TGF- $\beta$ -Moleküle werden inaktiv von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert und nach Bindung an LTBP (*Latent Transforming Growth Factor-beta Binding Protein*) beispielsweise in der Knochenmatrix gespeichert (MUNDY et al. 1995). Proteolytisches Abspalten des N-terminalen Endes aktiviert das Molekül. TGF- $\beta$  ist ein multifunktionales Molekül und beeinflusst die Adhäsion, die Proliferation und die Apoptose einer Reihe von Zelltypen (MOHAN und BAYLINK 1991). Es ist beteiligt an Remodellationsprozessen und Reparaturvorgängen, wobei es die Produktion von Proteinen im Sinne der Mineralisation der Extrazellulärmatrix koordiniert (CENTRELLA et al. 1991). Dosisabhängig besteht ebenfalls ein positiver Effekt für die Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen: Niedrige Dosen erzielen positive Effekte, wohingegen sehr hohe Mengen diese Prozesse negativ beeinflussen (GARG 2006c). Abgesehen von den direkten Effekten ist TGF- $\beta$



indirekt über Induktion von VEGF in der Lage, Knochenwachstum zu fördern (SAADEH et al. 1999).

### 1.3.5 BMP

*Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) sind meist homodimere Proteine, verbunden über zwei Disulfidbrücken mit einem Molekulargewicht von circa 30 kDa, von denen heute verschiedene Subtypen bekannt sind (GERSTENFELD et al. 2007). Innerhalb der BMP-Proteinfamilie lassen sich die einzelnen Vertreter nach funktionellen und strukturellen Gesichtspunkten weiter unterteilen (KAWABATA et al. 1998). Die abgeleiteten Aminosäuren der BMP-2 bis BMP-9 wurden der TGF- $\beta$ -Superfamilie zugeordnet (SCHLIEPHAKE 2002), wobei BMP-2, 4, 6 und 7 (OP-1-Gruppe, *Osteogenic Protein-1*) die größte osteoinduktive Potenz aufzuweisen scheinen (SCHMIDT-ROHLFING et al. 2009). BMP-1 hingegen gehört nicht zur TGF- $\beta$ -Superfamilie und besitzt auch keine osteoinduktiven Eigenschaften (KUEBLER 1997). Während der frühen Embryogenese spielen BMPs eine entscheidende Rolle als zentrales Morphogen etwa bei der Mesoderminduktion oder der Neurogenese (DALE und JONES 1999). Zusätzlich regulieren diese pleiotropen Proteine im adulten Organismus essentielle Funktionen bei der Gewebeheilung, Homöostase und Wachstumskontrolle in einer Vielzahl diverser Organe und Gewebetypen (DANESH et al. 2009; REDDI 1994). Postnatal ist einer der beachtetsten Aspekte der *Bone Morphogenetic Proteins* die Fähigkeit, mesenchymale Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten zu differenzieren sowie chemotaktisch auf einige osteoblastenartige Zellen zu wirken (CANALIS 1985; GARG 2006c). Zudem sind sie in der Lage, an ektopter Stelle im Körper Knochen zu induzieren (URIST und STRATES 1971), wobei BMP-3 hiervon ausgenommen ist und diese Fähigkeit nicht besitzt (HOFFMANN et al. 2001). Diese Fähigkeit ist einzigartig (WOZNEY 1989). Es ist folglich möglich, undifferenzierte mesenchymale Zellen durch Chemotaxis zu rekrutieren und die komplette Kaskade der Knochenheilung stattfinden zu lassen (REDDI 1997). BMPs stimulieren in geringer Menge die Proliferation von Osteoblasten und in höheren Konzentrationen eher die osteoblastäre Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (SIKAVITSAS et al. 2001). Sie scheinen außerdem vor allem in den frühen Phasen der knöchernen Regeneration von entscheidender Bedeutung zu sein (OKUBO et al. 2002). Die Signalmoleküle der BMP-Familie vermitteln ihre zellulären Effekte durch Bindung an zwei Typen von Serin/Threonin-Rezeptoren (KAWABATA et al. 1998). Diese unterscheiden sich in einen Typ I- und einen Typ II-Rezeptor, die mit unterschiedlicher Bindungsaffinität durch die verschiedenen BMP-Moleküle angesprochen werden (ALLENDORPH et al. 2007). Die konstitutiv aktive Kinasedomäne des Typ II-Rezeptors hat dabei immer die Funktion, den Typ I-Rezeptor durch Phosphorylierung zu aktivieren. Der nun aktivierte Typ I-Rezeptor leitet im folgenden Schritt das extrazelluläre Signal

durch Effektorproteine weiter (JENSEN et al. 2010). Diese sind entweder Rezeptor-SMAD (R-SMAD) Proteine oder *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPKs), wie *Extracellular Signal Regulated Kinase* (ERK) und die *C-Jun N-Terminal Kinase* (JNK) oder p38-Kinase (MIYAZONO 2000). Der SMAD Signalweg ist mittlerweile gut untersucht (HELDIN et al. 1997) und interagiert mit den anderen Signalwegen (HOFFMANN et al. 2001). Die R-SMADs 1, 5 und 8 sind die Haupteffektorproteine des BMP-Systems und werden durch die Typ I-Rezeptoren phosphoryliert und aktiviert (ALVAREZ et al. 2012). Diese bilden daraufhin mit SMAD 4 als einzigem Vertreter der Co-SMADs einen Komplex, der im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen aktiviert.

Die Herstellung der rekombinanten BMP-2-Dimere durch das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) stellt eine relativ günstige Variante dar (VALLEJO et al. 2002). Reinigungsprotokolle versichern die biologische Aktivität der entstandenen Cytokine (WENDLER et al. 2005). Die Kosten für BMP-7 sind im Vergleich um ein vielfaches höher (HINSENKAMP und COLLARD 2015). Versuche, humanes BMP direkt aus dem Knochen für kommerzielle Zwecke zu gewinnen, zeigen sich als sehr aufwendig und wenig ergiebig.

Des Weiteren scheint das Auftreten von transienten Antikörpern im Tiermodell bei BMP-2 in Relation zu BMP-7 um ein vielfaches niedriger zu sein, wobei beide Faktoren als sicher eingestuft werden, sofern sie vorschriftsgemäß angewandt werden (POYNTON und LANE 2002).

### 1.3.6 VEGF

*Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGFs) sind homodimere Proteine von etwa 40 kDa und stellen eine Unterfamilie der PDGF-Familie dar (ALVAREZ et al. 2012; FERRARA und HENZEL 1989). Sie dienen als zellspezifische Wachstumsfaktoren (KLEINHEINZ et al. 2005) und spielen bereits während der Vaskulogenese des Embryos eine entscheidende Rolle (FLAMME et al. 1995). Es gibt eine Reihe von Modifikationen: VEGF-A bis D wie auch PLGF (*Placenta-Like Growth Factor*) (BREEN 2007), die durch eine Vielzahl von Zellen, beispielsweise Fibroblasten (FERRARA 2004), Chondrozyten (GERBER und FERRARA 2000) oder Osteoblasten (GOAD et al. 1996) produziert werden. VEGF-A, welches die beim Menschen häufigste Form ist, kommt durch alternatives *Splicing* wiederum in fünf Isoformen vor, die sich hinsichtlich ihrer Aminosäureanzahl unterscheiden (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>). VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> sind die dominierenden Isoformen (FIEBICH et al. 1993; OLSSON et al. 2006) und sind vor allem in der frühen Phase der Wundheilung detektierbar (UCHIDA et al. 2003). VEGF kommt ubiquitär vor, wobei die kleineren Isoformen eher in löslicher Form sezerniert werden, während größere Formen mit ihren transmembranösen Domänen mit den sezernierenden Zellen assoziiert bleiben, bis sie durch Proteolyse

freigesetzt werden (J LI et al. 2003). VEGF wird beispielsweise durch Plasmin, Laktat oder Metalloproteinasen (MMPs) aktiviert (BREEN 2007). Dies führt zur Bindung an spezifische transmembranöse Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. VEGFR1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) fördert die Migration von Makrophagen und Monocyten und wird von VEGF-A, VEGF-B und PLGF gebunden. Zusätzlich ist ein negativer Einfluss der VEGFR1 auf die VEGFR2 beschrieben worden. VEGFR2 wird durch VEGF-A (DAWSON et al. 2006) und VEGF-E gebunden und hat entscheidende Funktion während physiologischer sowie pathophysiologischer Neovaskularisation. VEGF-C und VEGF-D binden an VEGFR3, wodurch das lymphatische System aufgebaut und aufrechterhalten wird (OLSSON et al. 2006).

Die Angiogenese während der Geweberegeneration und Entzündungsreaktion, die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die Rekrutierung von Endothelvorläuferzellen gehören zu den zentralen Funktionen von VEGF-A im adulten Menschen (BREEN 2007; FERRARA 2004; FERRARA et al. 1992). Ein kontinuierlicher Release von VEGF verhindert die Apoptose von Endothelzellen (FERRARA und GERBER 2001; GERBER et al. 1998). Hypoxie, insbesondere HIFs (*Hypoxia-Inducible Factors*) und niedriger Sauerstoffpartialdruck, sowie eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Cytokinen (TGF- $\beta$  1, IGF) induzieren die Sekretion von VEGF und deren Rezeptoren vor allem aus Chondrozyten und Osteoblasten, die an der Entstehung eines stabilen und ausgewachsenen Blutgefäßnetzwerks beteiligt sind (FERRARA 1996; NOR et al. 1999; OLSSON et al. 2006). In der Geweberegeneration ist VEGF-A folglich in mehr als einer Art und Weise beteiligt: Indem neu gebildete Blutgefäße nicht nur den Sauerstofftransport aufrecht erhalten, sorgen diese auch für die Bereitstellung undifferenzierter Vorläuferzellen (PENG et al. 2005).

Die Herstellung von rekombinantem VEGF<sub>165</sub> ist unter anderem durch Insekten (FIEBICH et al. 1993) oder durch das Bakterium *E. coli* möglich (KANG et al. 2013).

## 1.4 Probleme und Zielsetzung

Aus den bisherigen Ausführungen wurde deutlich, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt kein optimales Knochenersatzmaterial zur Verfügung steht, welches zur Behandlung knöcherner Defekte im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich eingesetzt werden kann. Es scheint jedoch gesichert, dass eine optimale Biokompatibilität, ein enger Verbund zwischen Knochen und Knochenersatzmaterial, eine ausreichende Stabilität gegen das Einwachsen von Weichgewebe und eine Wirkung als Leitschiene für den neu zu bildenden Knochen zu den Mindestvoraussetzungen für eine therapeutisch erfolgreiche Anwendung gehören. Diese Faktoren sind bei Polylaktid als Knochenersatzmaterial erfüllt.

Bisherige Studien zeigten, dass die Inkorporation eines Signalproteins in reines Poly-DL-Laktid möglich ist (GRUBER et al. 2009) und so das Material um die osteoinduktive Komponente ergänzt werden kann. Die vorliegende Studie betritt hier Neuland, denn die Beladung mit mehreren Cytokinen sowie die Kombination des reinen PDLLA mit Calciumcarbonat könnten zu erheblich anderen Ergebnissen führen. Die Zielsetzung dieser experimentellen Studie war es, die Hypothese zu testen, ob PDLLA/ Calciumcarbonat-Komposit mit mehreren Faktoren durch den Vorgang des Lyophilisierens und Aufschäumens beladen werden kann und eine kombinierte anhaltende Freisetzung von biologisch aktiven Molekülen bereitstellt, ohne dabei einen pH- Abfall während der Degeneration des Trägermaterials festzustellen.

Im Vordergrund der durchzuführenden In-vitro-Studie stand die Auswirkung der Materialcharakteristika der individuell hergestellten resorbierbaren osteoinduktiven Implantate im Hinblick auf folgende Fragestellungen:

1. Grundlegende Charakterisierung der Freisetzungskinetik der jeweiligen Wachstumsfaktoren aus dem Gerüst.
2. Auswirkung auf die Freisetzungskinetik bei gleichzeitiger Beladung der Gerüste mit einem osteogenen (rhBMP-2) und einem angiogenen (rhVEGF-A<sub>165</sub>) Wachstumsfaktor.
3. Nachweis der biologischen Wirksamkeit der freigesetzten Faktoren im Einzelnen und in ihrer Kombination sowohl im Hinblick auf die Induktion osteogener Differenzierung mesenchymaler Zellen als auch auf die proliferationsfördernde Wirkung für Endothelzellwachstum In-vitro an etablierten Zelllinien.

Wissenschaftlich wird sowohl auf Einzelzellniveau eine optimierte Freisetzungskinetik für die Wachstumsfaktoren isoliert identifiziert als auch die mögliche Interaktion der beiden Faktoren bei der Aktivierung der zellbiologischen Prozesse auf der In-vitro-Ebene beschrieben. Unter standardisierten Laborbedingungen wurde das PDLLA/CaCO<sub>3</sub>-Granulat jeweils mit verschiedenen Mengen rhBMP-2 oder rhVEGF-A<sub>165</sub> und in Kombinationen beider Faktoren versetzt und in einem hyperkritischem CO<sub>2</sub>-Aufschäumprozess in zylindrische Tablettenformen gepresst. Die auf diese Weise hergestellten Implantate wurden in den folgenden Versuchsaufbauten untersucht.

Ziel der Untersuchung ist es, aus diesen Ergebnissen eine Verbesserung des Kompositmaterials in Hinblick auf die physiologische und ökonomische klinische Anwendung abzuleiten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Laborausstattung

BioPhotometer:	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg <a href="http://www.eppendorf.de">www.eppendorf.de</a>	Photometer:	Tecan GENios Plus Tecan Deutschland GmbH Theodor-Storm-Straße 17 D-74564 Crailsheim <a href="http://www.tecan.com">www.tecan.com</a>
CASY:	Casy Modell TT Roche Diagnostics Sandhoferstr. 116 D-68305 Mannheim <a href="http://www.roche-applied-science.com">www.roche-applied-science.com</a>	Pipetten und Mehrkanalpipetten:	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg <a href="http://www.eppendorf.de">www.eppendorf.de</a>
Cryo freezing container:	"Mr. Frosty" Fisher Scientific GmbH Im Heiligen Feld 17 D-58239 Schwerte <a href="http://www.de.fishersci.com">www.de.fishersci.com</a>	Pipettenspitzen und Röhrchen:	Sarstedt AG & Co Postfach 1220 D-51582 Nümbrecht <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a>
Cups:	Reaktionsgefäße 1.6 ml, farblos, Low Binding Artikelnummer: 710176 Biozym Scientific GmbH Steinbrinksweg 27 D-31840 Hess. Oldendorf <a href="http://www.biozym.com">www.biozym.com</a>	Platten:	Cellstar 24 Well Cell Culture Plate Bestellnummer: 662160 Lotnummer: E10050H1 Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse 2 D-72636 Frickenhausen <a href="http://www.greinerbioone.com">www.greinerbioone.com</a>
Eismaschine:	Sanyo Tiefkühlschrank Sanyo Electric Biomedical CO., Ltd, Japan Bantorfer Straße 6 D-31542 Bad Nenndorf <a href="http://www.sanyo-biomedical.de">www.sanyo-biomedical.de</a>	Präzisionswaage:	Sartorius AG Weender Landstr. 94-108 D-37075 Göttingen <a href="http://www.sartorius.de">www.sartorius.de</a>
Kulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> :	Sarstedt AG & Co Postfach 1220 D-51582 Nümbrecht <a href="http://www.sarstedt.com">www.sarstedt.com</a>	Schüttler/ Vortexer:	MS2 Minishaker IKA – Werke GmbH & Co. KG Janke & Kunkel-Str. 10 D-79219 Staufen <a href="http://www.ika.com">www.ika.com</a>
Labor- Rollmischer:	SRT9D Bibby Scientific Limited Beacon Road Stone UK-Staffordshire ST15 0SA <a href="http://www.stuart-equipment.com">www.stuart-equipment.com</a>	Sterilbank:	Biohazard Cleanair En12469 Kuipersweg 37 D-3449 JA Woerden <a href="http://www.cleanairbv.nl">www.cleanairbv.nl</a>
Lyopylle:	Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH An der Unteren Söse 50 D-37520 Osterode am Harz <a href="http://www.martinchrist.de">www.martinchrist.de</a>	Thermomixer comfort:	Eppendorf AG Barkhausenweg 1 D-22339 Hamburg <a href="http://www.eppendorf.de">http://www.eppendorf.de</a>
Mikroplatteninkubator:	Thermostar BMG LABTECH GmbH Allmendgruen 8 D-77799 Ortenberg <a href="http://www.bmglabtech.com">www.bmglabtech.com</a>	Wasserbad:	Memmert GmbH + Co. KG Äußere Rittersbacher Straße 38 D-91126 Schwabach <a href="http://www.memmert.com">www.memmert.com</a>
Mikroskopie:	Axiovert Carl Zeiss Vision GmbH Zeppelinstraße 4 D-85399 Hallbergmoos <a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a>	Zellkulturinkubator:	Sanyo Electric Biomedical CO., Ltd, Japan Bantorfer Straße 6 D-31542 Nenndorf <a href="http://www.sanyo-biomedical.de">www.sanyo-biomedical.de</a>
		Zentrifuge:	Tischkühlzentrifuge 2K 15C Sigma Laborzentrifugen GmbH Postfach 1713 D-37507 Osterode am Harz <a href="http://www.sigma-zentrifugen.de/">www.sigma-zentrifugen.de/</a>

## 2.2 Zellen

C2C12:	Bestellnummer: ACC 565 DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Inhoffenstraße 7B D-38124 Braunschweig <a href="http://www.dsmz.de">www.dsmz.de</a>	HUVEC:	Bestellnummer: C2517 A Lotnummer: 7F3617 Lonza Parc Industriel de Petit-Rechain BE-4800 Verviers <a href="http://www.lonza.com">www.lonza.com</a>
--------	--	--------	--

## 2.3 Reagenzien und Lösungen

### 2.3.1 Beladen der Implantate

Formen:	PTFE Aluminium: Gebrüder Martin GmbH & Co. KG Ludwigstaler Str. 132 D-78532 Tuttlingen <a href="http://www.klsmartin.com">www.klsmartin.com</a>	rh BMP-2:	Katalognummer: 200-002 ReliaTech GmbH Lindenerstr. 15 D-38300 Wolfenbüttel <a href="http://www.reliatech.de">www.reliatech.de</a>
Granulat:	PDLLA/CaCO <sub>3</sub> Gebrüder Martin GmbH & Co. KG Ludwigstaler Str. 132 D-78532 Tuttlingen <a href="http://www.klsmartin.com">www.klsmartin.com</a>	rh VEGF <sub>165</sub> :	Katalognummer: 300-075 ReliaTech GmbH Lindenerstr. 15 D-38300 Wolfenbüttel <a href="http://www.reliatech.de">www.reliatech.de</a>

### 2.3.2 Zellkultur

Ampuva:	Fresenius Kabi Austria GmbH Hafnerstraße 36 A-8055 Graz <a href="http://www.fresenius-kabi.at">www.fresenius-kabi.at</a>	Medium:	DMEM, low glucose, GlutaMAX™, pyruvate (Gibco®) Katalognummer: 21885-108 Gibco Invitrogen Technologie Park Karlsruhe Emmy Noether Str. 10 D-76131 Karlsruhe <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a>
BSA:	Albumin Fraktion V Carl Roth GmbH + Co. KG Schoemperlenstrasse 3-5 D-76185 Karlsruhe <a href="http://www.carlroth.de">www.carlroth.de</a>		EGM®-2 BulletKit® EBM®-2 Endothelial Basal Medium & EGM-2 Single Quot Kit Suppl. und Growth Factors Bestellnummer: CC-3162 Lonza Parc Industriel de Petit-Rechain BE-4800 Verviers <a href="http://www.lonza.com">www.lonza.com</a>
Casyton:	Roche Diagnostics Sandhoferstr. 116 D-68305 Mannheim <a href="http://www.roche-applied-science.com">www.roche-applied-science.com</a>		
FKS:	Biochrom AG Leonorenstr. 2-6 D-12247 Berlin <a href="http://www.biochrom.de">www.biochrom.de</a>	PBS:	Katalognummer: P04-36500 Lotnummer: 1880551 PAN Biotech GmbH Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach <a href="http://www.pan-biotech.de">www.pan-biotech.de</a>
Gentamycin:	10 mg/ml, im Medium 2% Katalog: P06-03001 PAN Biotech GmbH Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach <a href="http://www.pan-biotech.de">www.pan-biotech.de</a>	Trypsin/ EDTA 0,25%:	Cataloge: P10-019500 PAN Biotech GmbH Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach <a href="http://www.pan-biotech.de">www.pan-biotech.de</a>

### 2.3.3 Biochemische Auswertung

Alkalische Phosphat.:	Bestellnummer: N2765 Sigma-Aldrich Chemie Gmbh Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>	ELISA:	Human VEGF-A Platinum ELISA Bestellnummer: BMS277/2CE Lotnummer: 48429000 Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocenter 2 A-1030 Vienna <a href="http://www.bendermedsystems.com">www.bendermedsystems.com</a>
BCA Test:	BCA Protein Assay Reagent Produktnummer: 23225 Lotnummer: LA141855 Perbio Science Deutschland Adenauerallee 113 Thermo Fisher Scientific D-53113 Bonn <a href="http://www.piercenet.com">www.piercenet.com</a>	IGE PAL® CA630:	Lotnummer: 0001412007 Bestellnummer: 56741-50ml-F Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
ELISA:	Rh BMP-2 ELISA: Lotnummer: PB060910 ELISA-Entwicklung GmbH & Co. KG Marie-Curie-Str. 1 D-53359 Rheinbach <a href="http://www.elisa-entwicklung.com">www.elisa-entwicklung.com</a>	Parafilm:	Pechiney Plastic Packaging Menasha, WI USA

## 2.4 Software

Endnote X5:	Thomson Reuters 3 Times Square New York, NY 10036 USA <a href="http://www.endnote.com">www.endnote.com</a>	Statistica Version 10	StatSoft GmbH 2300 East 14th Street Tulsa, OK 74104 USA <a href="http://www.statsoft.com">www.statsoft.com</a>
Microsoft Office Home and Student:	Microsoft Corporation One Microsoft Way Redmond, WA 98052-6399 USA <a href="http://www.microsoft.com">www.microsoft.com</a>	Adobe Acrobat 9 Pro	Adobe Systems Incorporated 345 Park Avenue San Jose, CA 95110-2704 USA <a href="http://www.adobe.com">www.adobe.com</a>
SAS® 9.3:	<b>SAS Institute GmbH</b> In der Neckarhelle 162 D-69118 Heidelberg <a href="http://www.sas.com">www.sas.com</a>		

## 2.5 Sterilbedingungen

Die gesamten Arbeiten in der Zellkultur sowie die Herstellung der verwendeten Materialien und Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen der Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Während aller Arbeitsschritte wurden Handschuhe getragen sowie die Flächen mit 80% Ethanol desinfiziert. Die Glasmaterialien, Instrumente und mehrfach verwendeten Geräte wurden im Autoklaven (10 min, 121 °C, 1 bar) sterilisiert. Die Lösungen und Medien wurden, sofern sie nicht steril von Hersteller geliefert wurden, steril filtriert (0,22 µm) und bei 4 °C gelagert. Alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders dargestellt, wurden unter den sterilen Bedingungen der Sicherheitswerkbank ausgeführt.

## 2.6 Herstellung der Implantate

Das für die Herstellung der Implantatgerüste notwendige Granulat aus amorpher Poly-D,L-Laktidsäure (PDLLA) wurde mit Nanokristallen aus amorphem carbonathaltigem

Calciumphosphat ( $\text{CaCO}_3$ , 12  $\mu\text{m}$ ) im Mischungsverhältnis 4:1 versetzt und von der Firma KLS Martin (Tuttlingen) für die hier vorliegende Studie zur Verfügung gestellt.

Die für das Beladen der Implantate notwendigen Wachstumsfaktoren wurden von der Firma ReliaTech (Wolfenbüttel) geliefert. Das rekombinant hergestellte (*E. coli*) humane *Bone Morphogenetic Protein-2* (rhBMP-2) wurde in 50 mM Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) gelöst und mit einer Konzentration von 890  $\mu\text{g/ml}$  zur Verfügung gestellt. Der rekombinant hergestellte (*E. coli*) humane *Vascular Endothelial Growth Factor* (rhVEGF- $\text{A}_{165}$ , rhVEGF $_{165}$ ) mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  wurde ebenfalls in 50 mM  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  verdünnt.

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Implantate.**

Einteilung der Gruppen nach Art und Menge der zugesetzten Wachstumsfaktoren. Die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mengen basierte auf Erkenntnissen, welche in Vorversuchen gewonnen werden konnten.

Gruppe 1 (n=3)	Gruppe 2 (n=3)	Gruppe 3- BMP & Gruppe 3- VEGF (n=6)
rhBMP-2	rhVEGF- $\text{A}_{165}$	rhBMP-2/rhVEGF- $\text{A}_{165}$
1600 $\mu\text{g/g}$	400 $\mu\text{g/g}$	800 $\mu\text{g/g}$ / 100 $\mu\text{g/g}$
800 $\mu\text{g/g}$	100 $\mu\text{g/g}$	800 $\mu\text{g/g}$ / 25 $\mu\text{g/g}$
400 $\mu\text{g/g}$	25 $\mu\text{g/g}$	400 $\mu\text{g/g}$ / 100 $\mu\text{g/g}$
200 $\mu\text{g/g}$	4 $\mu\text{g/g}$	400 $\mu\text{g/g}$ / 25 $\mu\text{g/g}$
0 $\mu\text{g/g}$ (Kontrolle)	0 $\mu\text{g/g}$ (Kontrolle)	0 $\mu\text{g/g}$ / 0 $\mu\text{g/g}$ (Kontrolle)

Das für die einzelnen Gruppen (s. Tabelle 2) errechnete Volumen der jeweiligen Faktoren wurde mit der entsprechenden Menge Reinstwasser versetzt, sodass das jeweilige Granulat „erdfeucht“ (1 g Polymer/ 400  $\mu\text{l}$  Faktor bzw. Reinstwasser) angesetzt werden konnte. Das angesetzte Granulat wurde daraufhin für 1 Stunde in einem Röhrchen auf einem Rotorschüttler gut durchmischt. Die Implantate der Gruppe 3 wurden in doppelter Menge hergestellt, da diese sowohl mit den mit rhBMP-2 allein beladenen Implantaten als auch mit jenen, die mit rhVEGF- $\text{A}_{165}$  allein beladen waren, verglichen werden sollen.

Das Granulat für die Kontrollimplantate wurde nur mit Reinstwasser angesetzt und entsprechend dem Granulat der mit Wachstumsfaktoren beladenen Implantate behandelt. Die Kontrollimplantate dienten während der gesamten Versuche als Leerkontrollen.

### 2.6.1 Gefriertrocknung

In einem ersten Schritt wurde das beladene Granulat bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Für die Lyophilisierung wurden die Deckel anschließend in steriler Umgebung entfernt und mit Parafilm wieder verschlossen. Der Folienschluss wurde mit einer sterilen Kanüle fein perforiert und die Tubes in einem nächsten Schritt in flüssigem Stickstoff ( $\text{LN}_2$ ) schockgefroren. Das im Reaktionsgefäß befindliche zugeführte Reinstwasser kristallisierte dabei vollständig zu Eis. Die Reagenzgefäße wurden daraufhin in das Gefriertrocknungsgerät eingebracht. Durch Öffnen des Zwischenventils wurden



Kondensator und Vakuumpumpe für die Haupttrocknung freigegeben. Während der Haupttrocknung (-15 °C bis -20 °C) wurde ein negativer Druck von 1 - 4 mbar erzeugt, sodass das Wasser sublimierte und aus dem Lyophilisat entwich. Dieser Vorgang dauerte etwa 12 Stunden. Die Lagerung des gefriergetrockneten Granulats fand bei -70 °C statt.

Das Lyophilisat wurde für die Formgebung der Implantatgerüste für jedes Implantat zu je 0,06 g abgewogen. Die Formen bestehen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und wurden von der Firma KLS Martin (Tuttlingen) eigens angefertigt und für die Studie zur Verfügung gestellt (s. Abbildung 2). Das Material der Formen war für CO<sub>2</sub> permeabel, sodass das Gas in die Form eindringen und während Dekompression wieder austreten konnte, erweichte selbst jedoch nicht. Die Durchlässigkeit durfte nicht so hoch sein, dass der erweichte Kunststoff die Poren der Pressform durchdringen und die Oberfläche keine Verbindung mit dem aufzuschäumenden Kunststoff eingehen konnte. Somit war eine problemlose Ablösung zwischen Implantat und Hohlform möglich. Die Form im Gesamten bestand aus zwei voneinander trennbaren PTFE-Platten, die übereinander gelegt wurden. Eine der Platten hatte Mulden, die der Formgebung der Implantate dienten. Um beiderseits ein Ausbeulen der PTFE-Platten während des Schäumungsvorganges zu verhindern, wurde die Form unabdingbar zur Gewährleistung der Formstabilität der Implantatkörper jeweils nach außen durch Metallplatten aus Edelstahl verstärkt. Wegen der Gefahr der gegenseitigen akzidentellen Verunreinigung wurden für das Bestücken der Formen insgesamt drei Formen, für die jeweiligen Gruppen je eine, verwendet.

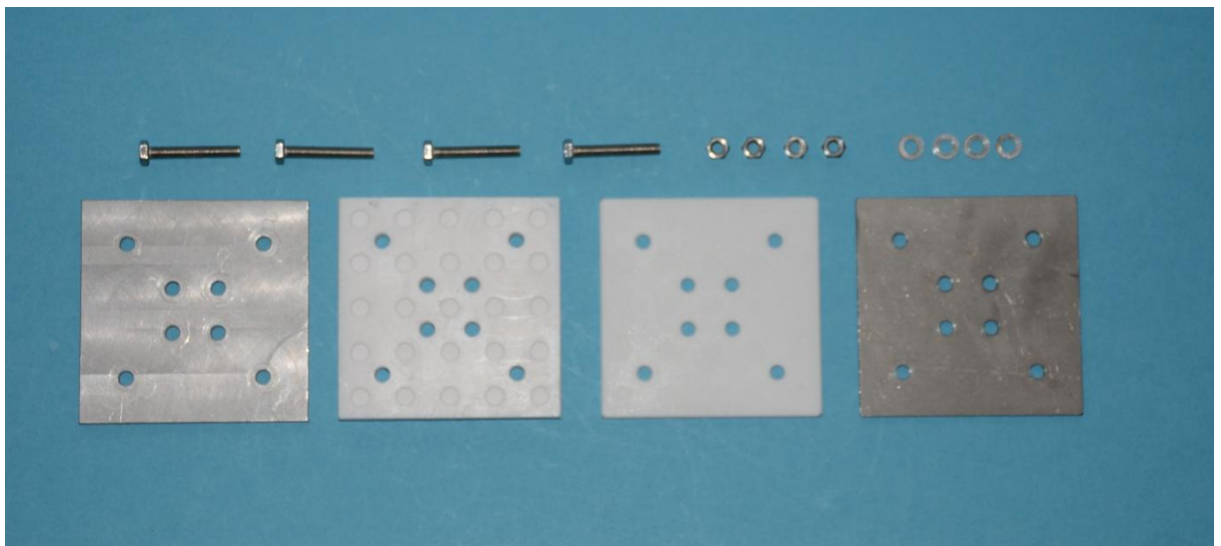


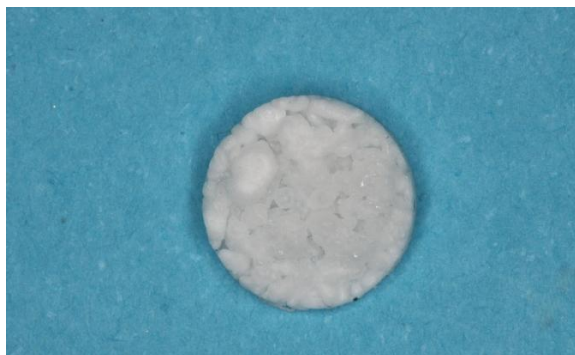
Abbildung 2: Fotografie der Formen.

PTFE-Hohlformen für die Herstellung der porösen PDLLA-Implantate durch das Begasungsverfahren mit CO<sub>2</sub>. Der Begasungsdruck von 100 bar erfordert stabile Konterplatten aus Edelstahl. Löcher in den Platten dienen der dichten Verschraubung der einzelnen Formbestandteile. Deutlich zu sehen die Vertiefungen der zweiten Platte von links. Diese Mulden (3 mm x 8 mm) dienen der Formgebung der Probenkörper.

## 2.6.2 Begasungsprozess

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Gase (He, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) zur Begasung des Polylaktids getestet, jedoch ist bislang die Herstellung eines Kunststoffes mit dem entsprechenden Porenvolumen von 200 - 400 µm nur bei der Verwendung von CO<sub>2</sub> erfolgreich gelungen (SCHILLER et al. 2004). Porengrößen von 240 µm stellten sich als rechnerisches Optimum dar (ASCHERL et al. 2006). Einerseits stand das Porenvolumen der Implantate in Abhängigkeit zum Begasungsdruck, denn je geringer der Druck, desto geringer der Porositätsgrad. Andererseits konnte die Dekompressionszeitspanne das Porenvolumen beeinflussen: durch eine schnellere Dekompression wurde das Porenvolumen größer. Außerdem war es erforderlich, dass die Temperatur während des Begasungsvorgangs oberhalb der kritischen Temperatur von CO<sub>2</sub> lag, jedoch nicht höher als die Glasübergangstemperatur des PDLLA, um das Zusammenfallen des fertigen Polymerschaums zu verhindern. Es ergab sich somit ein Temperaturfenster zwischen 35 °C und 55 °C, bei dem der gesamte Prozess stattfand. Diese Vorgaben wurden eingehalten.

Das exakt abgewogene gefriergetrocknete Granulat wurde unter der Sicherheitswerkbank in die einzelnen Mulden eingebracht. Im Anschluss wurden die Formen mittels Schrauben dicht verschlossen und in die CO<sub>2</sub>-Gaskammer eingebracht. Der Autoklav erreichte während des Prozesses einen Eigendruck von 100 bar, der für 2 Stunden gehalten wurde, um eine homogene Gaskonzentration im Kunststoff zu gewährleisten. Der Vorgang wurde mit einer sich anschließenden linearen Entspannung auf den Umgebungsdruck für eine Dauer von 20 Minuten abgeschlossen. Es entstanden 3 mm dicke und im Durchmesser 8 mm breite zylindrische Implantate (s. Abbildung 3). Die in dieser Arbeit erreichte Porengröße betrug etwa 400 µm (s. Abbildung 4).



**Abbildung 3: Fotografie des Implantatkörpers.**

Ein aus der PTFE- Form gelöster Implantatkörper in der Detailaufnahme. 8 mm x 3 mm (Durchmesser x Höhe).

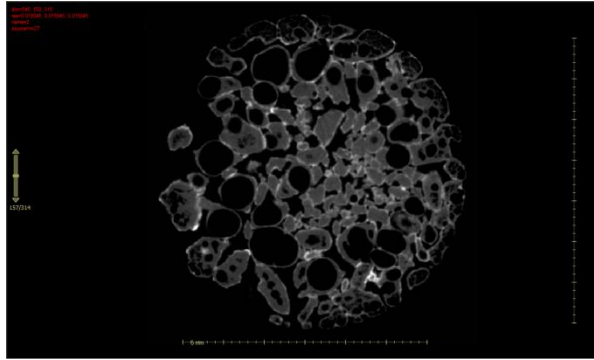


Abbildung 4: Mikro- Computertomographie des Implantatkörpers.

Darstellung des Probekörpers im Querschnitt bereitgestellt von Dr. C. Dullin (Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen). Gerät: Explore locus SP (GE Healthcare). Bildparameter: 1000 Projektionen / 360°, Belichtungszeit 5 Sekunden, Auflösung 8  $\mu\text{m}$ , Rekonstruktion 16  $\mu\text{m}$ , 72 KVp, 110  $\mu\text{A}$ . Das Ergebnis war ein Kunststoffkörper mit überwiegend isolierten Poren, einzelne Verbindungen traten jedoch auf.

## 2.7 Bestimmung der Wachstumsfaktorfreisetzung

### 2.7.1 Vorbehandlung der Zellkulturplatten

Die verwendeten Zellkulturplatten bestanden aus hydrophobem Polystyrol und Polyethylenterephthalat. Die Oberflächen der Kunststoffprodukte wurden jedoch vom Hersteller mit einem speziellen physikalischen Verfahren behandelt. Dadurch wurde die Oberfläche hydrophilisiert und folglich die Adhäsion von Zellen an der Kunststoffoberfläche wesentlich verbessert. Trotzdem konnten unspezifische Bindungen zu Proteinen auftreten. Aufgrund dessen wurden die Multiwellplatten mit inerten Proteinen, wie zum Beispiel BSA (*Bovine Serum Albumin* oder Rinderserumalbumin), blockiert. Die verwendeten 24-Well-Platten (Multiwellplatten) wurden mit 800  $\mu\text{l}$  der verwendeten Blockierungslösung (1% Albumin Fraktion V in *Phosphate- Buffered Saline* (PBS)) für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung entfernt. Jedes Loch wurde zweimal mit 800  $\mu\text{l}$  PBS und abschließend einmal mit 400  $\mu\text{l}$  des für den nachfolgenden Versuch benötigten Basalmediums gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurden die Lösungen durch Absaugen und Ausschlagen der Platten auf sterilem Zellstoff möglichst vollständig aus den Vertiefungen entfernt.

Des Weiteren wurden beschichtete *low binding*-Reagenzgefäße und Rörchchen genutzt.

### 2.7.2 Vorbereitung der Medien

Das fetale Kälberserum (FKS) stammte von einer gewählten Charge und wurde in Portionen aliquotiert, um häufige Auf- und Abtauprozesse zu vermeiden, und bei -20 °C tiefgefroren gelagert. Vor der Zugabe zum jeweiligen Medium (2%) fand ein langsamer

Auftauprozess im Wasserbad statt, im Anschluss daran wurde das Serum für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Als Basalmedium wurden für die Versuche der Implantate der Gruppe 1 und die der Gruppe 3- BMP des rhBMP-2-Nachweisversuchs DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, *low glucose*, GlutaMAX™, pyruvate, 500 ml) genutzt. Das Medium wurde mit 2% FKS und 2% Gentamycin versetzt.

Das EBM®-2 (Endothelial Basal Medium-2, 500 ml) wurde für die Versuche der Implantatgruppen 2 und 3- VEGF des rhVEGF<sub>165</sub>-Nachweisversuchs mit den Singlequots (EGM®-2 Single Quots, Kit® Supplements & Growth Factor) nach Herstellerangaben versetzt (EGM®-2 BulletKit®). Einer dieser Faktoren war der Wachstumsfaktor VEGF, der aufgrund des Versuchsaufbaus und der Fragestellung nicht zum Medium gegeben wurde, da er für die Proliferation der HUVEC-Zellen essentiell war und als Nachweis der biologischen Aktivität des aus den Implantaten freigesetzten VEGF dienen sollte. Wenn im Folgenden nicht ausdrücklich erwähnt, war das EBM®-2 Medium VEGF frei. Ausnahme bildete jedoch die Kultivierung der HUVEC-Zellen, wofür das vollständig angesetzte Medium bis 24 Stunden vor Versuchsbeginn verwendet wurde. Einen Tag vor dem Ausplattieren der Zellen für den Versuchsaufbau wurde das Medium abgezogen, um durch wachstumsfaktorfreies Medium ersetzt zu werden.

### 2.7.3 Releaseversuch

Je eine vorbehandelte (vgl. Kapitel 2.7.1) 24-Multiwellplatte wurde pro Gruppe verwendet. Bevor die Implantate in die Wells gegeben wurden, waren diese mit Medium versetzt worden. Die Wells, in die die Implantate der Gruppe 1 und die der Gruppe 3- BMP des rhBMP-2-Versuchs gesetzt werden sollten, wurden mit 2 ml DMEM Medium versetzt. Die Wells, welche die Implantatgerüste der Gruppe 2 und Gruppe 3- VEGF des rhVEGF<sub>165</sub> Versuchs gesetzt werden sollten, wurden mit je mit 2 ml EGM®-2 Medium (wachstumsfaktorfrei) befüllt. Pro Gruppe und Konzentration wurden je drei identische Implantate für den Versuch verwendet. Die Implantate wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus der entsprechenden Mulde der PTFE-Form entfernt und in das Medium gegeben (s. Abbildung 5 und Abbildung 6). Entsprechend des Versuchsaufbaus wurden die Überstände nach 1, 12 und 24 Stunden und weiterhin nach 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 27 Tagen komplett aus den Wells entfernt und in je zwei Reaktionsgefäße gegeben, hierbei 1,5 ml für die Zellkultur, und einmal 0,5 ml für die ELISA (*Enzym- Linked Immonosorbent Assay*)- Auswertung. Die Cups wurden fest verschlossen und bei -20 °C tiefgefroren. Die Implantatkörper wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten in neue 24-Multiwellplatten übergesetzt, nachdem in diesen neues Medium entsprechend dem Versuchsaufbau vorgelegt worden war.

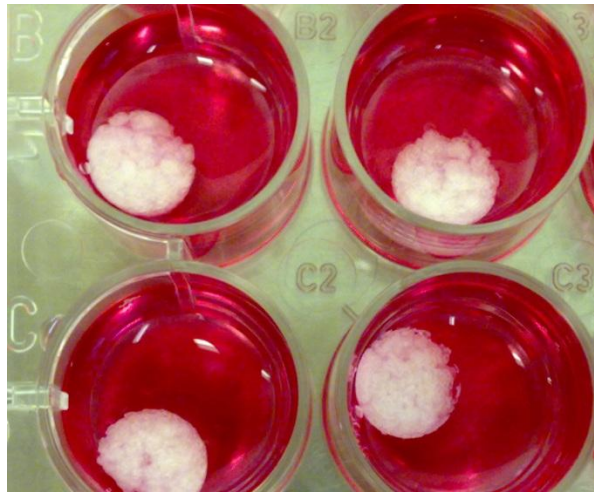


Abbildung 5: rhBMP-2-Releaseversuchsaufbau.

Ausschnitt aus der 24-Multiwellplatte. In den Vertiefungen 2 ml des DMEM Mediums. Darin enthalten die Implantate zum Zeitpunkt 144 Std der BMP Gruppe 1.

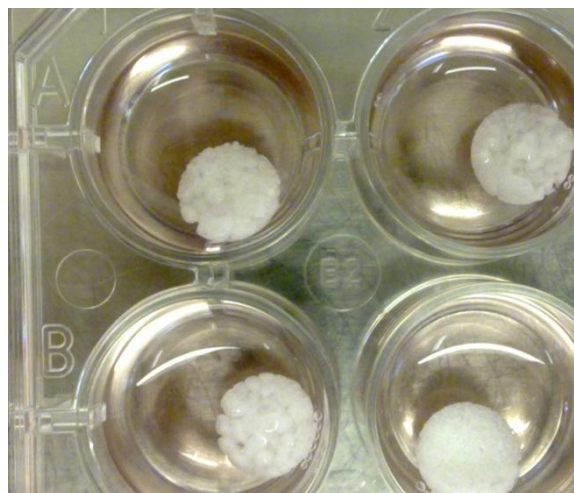


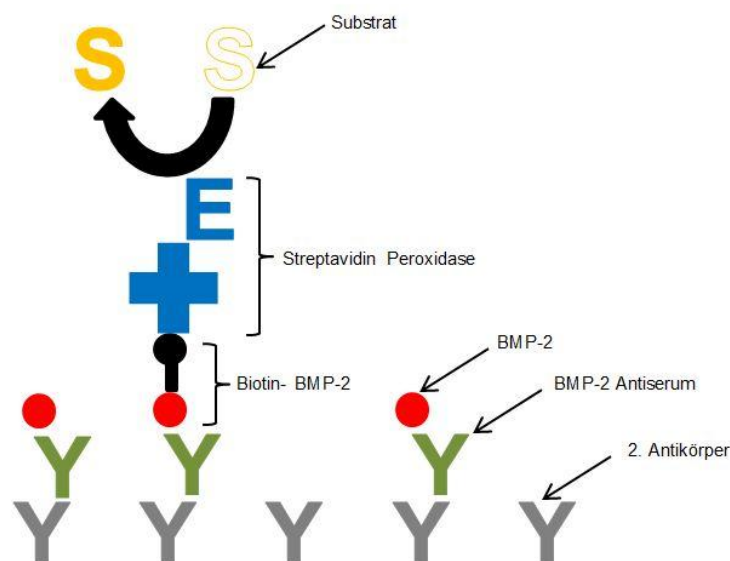
Abbildung 6: rhVEGF<sub>165</sub>-Releaseversuchsaufbau.

Ausschnitt aus der 24-Multiwellplatte. In den Vertiefungen 2 ml des EGM<sup>®</sup>-2 Mediums. Darin enthalten die Implantate zum Zeitpunkt 144 Std der VEGF Gruppe 2.

## 2.7.4 BMP-2-Elisa

Der in dieser Studie verwendete Enzymimmunoassay diente der Bestimmung von bakteriellem rhBMP-2 in Zellkulturmedium. Dieser „*Enzym Linked Immunosorbent Assay*“ wurde eigens für die Bestimmung des rhBMP-2-Proteins entwickelt (ELISA-Entwicklung GmbH & Co. KG). Hierbei handelte es sich um einen kompetitiven Test mit einem zweiten Antikörper und einem Biotin-Streptavidinsystem (Abbildung 7). Bei den Antikörpern handelte es sich um polyklonale Kaninchenantikörper. Die untere Nachweisgrenze lag bei < 100 pg/ml bei optimalen Inkubationsbedingungen. Die Menge der gebundenen Antikörper war umgekehrt proportional zur Farbentwicklung.

Zunächst wurden 100 µl der Standards, der Kontrollen und der entsprechend vorverdünnten Proben in die mit einem zweiten Antikörper beschichteten Mikrotiterwells pipettiert. Ab diesem Schritt sollte laut Herstellerangaben darauf geachtet werden, dass die Vertiefungen ab diesem Zeitpunkt nicht austrocknen. Des Weiteren wurde nach jedem Pipettierschritt und während der Inkubationszeiten die Mikropipettierplatte mit einer adhäsiven Klebefolie abgedeckt. Darauf folgte das Hinzufügen von 50 µl Antiserumlösung mit einer Mehrkanalpipette. Die Platte wurde für 120 Minuten bei Raumtemperatur (21 °C) im Mikroplatteninkubator unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Es bildete sich bei Vorhandensein von rhBMP-2 ein rhBMP-2-Antikörperkomplex, der durch seine hohe Affinität an den zweiten Antikörper am Boden der Mikrotiterwells gebunden wurde. In einem nächsten Schritt wurde die Platte mit 50 µl der Tracerlösung versetzt. Die Inkubationszeit im Mikroplatteninkubator betrug 30 min, sodass sich Biotinyl-rhBMP-2 bildete. Es folgte im Anschluss an einen manuellen Waschprozess mit einer Waschlösung, der viermal wiederholt wurde, die Zugabe von 100 µl der Enzymlösung (Streptavidin-Peroxidase Konjugat). Die Platte wurde für 30 min auf dem Plattenschüttler inkubiert. Es wurden vier manuelle Waschprozesse angeschlossen. Danach wurden 100 µl der chromogenen TMB (3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine)- Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Die Zugabe sollte laut Gebrauchsanweisung unter möglichst wenig Lichteinstrahlung durchgeführt werden. Dieser Vorgabe wurde Rechnung getragen. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur im Thermoshaker für 15 Minuten. Die im Folgenden stattgefundene Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl Stoppreagenz (1 M Salzsäure, HCl) pro Vertiefung beendet.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des BMP-Elisa-Prinzips.**

Schematische Darstellung des Testprinzips (Eigene Darstellung modifiziert nach der Testbeschreibung der Firma ELISA-Entwicklung GmbH & Co. KG).

Im Anschluss fand die sofortige Extinktionsbestimmung im Plattenphotometer (ELISA-Reader) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm statt, wobei die Differenz die Nettoextinktion ergab. Die Standardkurve wurde durch die Darstellung einer 4-Parametermethode erstellt. Die Absorption war umgekehrt proportional zu der rhBMP-2-Konzentration in der Probe.

### 2.7.5 VEGF-Elisa

Der humane VEGF-A-Elisa war ein Antikörper basiertes Nachweisverfahren für die quantitative Bestimmung von VEGF-A. Es handelte sich um einen nicht-kompetitiven Sandwich-Elisa. Die minimal messbare Dosis lag bei 7,9 pg/ml. Die Testverdünnung war 1:2.

In einem ersten Schritt wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte zweimal mit 400 µl des angesetzten Waschpuffers gewaschen, wobei der Waschpuffer je für 10 bis 15 Sekunden einwirken sollte. Ab diesem Schritt sollten die Vertiefungen laut Gebrauchsanweisung während des gesamten Versuchs nicht austrocknen. Diese Vorgabe wurde eingehalten. Als nächstes wurden je 100 µl der Standardverdünnungen, die nach Herstellerangaben extern in Cups hergestellt worden waren, in die Vertiefungen pipettiert. Die so hergestellten Verdünnungsreihen dienten zur Erstellung der Standardkurve. Im folgenden Schritt wurden 50 µl der Verdünnungslösung in die Probenvertiefungen und darauf 50 µl der jeweiligen Probe dazugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und bei Raumtemperatur (21 °C) für 120 min unter Verwendung des Schüttlers (100 U/min) inkubiert. Die in den Proben vorhandenen rhVEGF-A<sub>165</sub>-Moleküle konjugierten an die am Boden der Mikrotiterwells gebundenen Antikörper. Es wurden sechs manuelle Waschprozesse angeschlossen, sodass nicht gebundene biologische Komponenten entfernt werden konnten. Anschließend wurden 100 µl des Biotin-Konjugats in jedes der Wells pipettiert und die Platte wieder mit der Klebefolie verschlossen. Während der Inkubationszeit (60 min, 100 U/min, 21 °C im Thermoshaker) band ein Biotin-konjugierter Antikörper an das im letzten Schritt gebundene VEGF. Nach Ablauf der Zeit wurde der Inhalt der Wells entfernt, und es folgte erneut ein Waschprozess, der sechsmal wiederholt werden musste. Es folgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP in jedes der Wells. Die Klebefolie wurde erneut auf die Mikrotiterplatte geklebt und wiederum für 60 min mit den vorherigen Einstellungen auf dem Plattenschüttler inkubiert. Das Streptavidin-HRP konjugierte an den Biotin-markierten Antikörper. Es folgte nach Ablauf der Inkubationszeit erneut der bereits beschriebene Waschprozess. In alle Vertiefungen wurde daran anschließend 100 µl TMB-Substratlösung unter möglichst wenig Lichteinstrahlung zügig pipettiert. Die Inkubation der Mikrowellplatte erfolgte bei Raumtemperatur (21 °C) für 30 min. Unter Vermeidung starker

Lichteinstrahlung reagierte das Substrat mit HRP und bildete proportional zur rhVEGF-A<sub>165</sub>-Menge der Probe ein chromogenes Produkt, welches mit dem Photometer nach Abstoppen der Reaktion mit 1 M Phosphorsäure detektiert werden konnte. Die Messung erfolgte mit einem Plattenphotometer bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Darstellung der Standardkurve erfolgte mit der 5-Parameterdarstellung.

## **2.8 Zellkultur**

### **2.8.1 C2C12**

Die C2C12-Mausmyoblasten wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als *Cryopreserved Cells* in einem Umfang von  $2 \times 10^6$  Zellen geliefert (70% Medium, 20%FBS, 10% DMSO). Die C2C12-Zellen sind Subklone der Mausmyoblasten, Zelllinie des Mausstranges C31+. Die Zellen differenzieren sehr schnell und waren daher für In-vitro-Untersuchungen besonders geeignet. Die Behandlung mit BMP-2 leitete die reversible Differenzierung in die Osteoblastenzelllinie ein und induzierte die Produktion von alkalischer Phosphatase (BLAU et al. 1985; KATAGIRI et al. 1994). Die Bestimmung alkalischer Phosphatase diente als positiver Nachweis aktiver BMP-2-Moleküle aus den Implantaten.

#### **2.8.1.1 Kultivierung**

Vor Kultivierung der Zellen wurde die Anzahl der zur Aussaat benötigten Kulturflaschen berechnet. Es wurde eine Aussaatdichte von 4500 Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturflaschenoberfläche verwendet. Die Kulturflaschen wurden mit 1 ml DMEM Medium (10% FKS, 2% Gentamycin) pro 5 cm<sup>2</sup> Oberfläche befüllt und anschließend für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank für die Aufnahme der Zellen vorbereitet.

Die Cryovials wurden unter sterilen Bedingungen geöffnet, sofort wieder verschlossen und danach im 37 °C Wasserbad zügig aufgetaut. Sobald sich die Eiskristalle gelöst hatten, wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad genommen. Die Zellen wurden nun in den Cryovials mittels einer Mikropipette resuspendiert und in die Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) pipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung wurden die Kulturflaschen geschwenkt. Die mikroskopische Kontrolle der mit den C2C12-Zellen gefüllten Kulturflaschen wurde durchgeführt und die Kulturflaschen in den Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt.

#### **2.8.1.2 Mediumwechsel**

Vor jedem Mediumwechsel wurden alle Zellkulturplatten mikroskopisch auf bakterielle und fungizide Kontamination untersucht. Als Kultivierungsmedium für die C2C12-Zellen wurde DMEM (10% FKS, 2% Gentamycin) verwendet. Das Medium wurde am ersten Tag nach



der Aussaat und dann im Turnus von 2 Tagen gewechselt. Das Volumen betrug 1 ml Medium pro 5 cm<sup>2</sup>. Zum Mediumwechsel wurde das entsprechende Volumen (25 ml) Medium der vorher vorbereiteten Aliquots im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das verbrauchte Medium aus den Kulturflaschen wurde mittels einer Pasteurpipette abgezogen. Dabei wurde eine Verletzung des Zell-Monolayers verhindert. Das frische Medium wurde mit einer Einwegpipette in die Kulturflasche pipettiert. Dieser Vorgang fand nur einmal vor Versuchsansatz statt.

### **2.8.1.3 Subkultivierung**

Die Subkultivierung fand bei einer semikonfluenten Zelldichte unter mikroskopischer Kontrolle 4 Tage nach Auftauen der Zellen statt. Die erwärmte Trypsinlösung (37 °C, 2 ml) wurde nach sorgfältigem Abziehen des verbrauchten Mediums und nach einmaligem Waschen der Kultur mit 10 ml PBS auf die Zellen gegeben. Es folgte ein vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche und das Inkubieren für 3 bis 5 min bei 37 °C im Inkubator. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Kultur waren 90% der Zellen abgerundet und nicht mehr adhärent, sodass das Trypsin mit 10 ml Medium (DMEM, 10% FKS) neutralisiert wurde. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und die Zellzahl sowie die Vitalität mittels CASY (s. u.) ermittelt. Im Anschluss fand das Zentrifugieren der Zellsuspension bei 220 x g für eine Dauer von 5 min statt. Der Überstand wurde bis auf 100 - 200 µl aspiriert. Es folgte das Verdünnen der Zellen mit Medium (DMEM, 2% FKS) auf  $2 \times 10^4$  Zellen pro 100 µl, sodass je 100 µl mit je 20000 C2C12-Zellen in eines der mit bereits 1 ml Medium des Releaseversuchs befüllten Wells der Multiwellplatte ausplattiert werden konnte. Die Zellen wuchsen für 3 Tage mit täglicher mikroskopischer Kontrolle. Es erfolgte im Anschluss die Bestimmung der alkalischen Phosphatase.

### **2.8.1.4 Zellzahlbestimmung mittels CASY**

Das automatisierte Zählen der Zellen erfolgte nach dem Widerstandsmessprinzip mit Hilfe des Zellzählgeräts CASY (Gerät CASY<sup>®</sup> Model TT, Messkapillare 150 µm, Roche). Hierbei wurde die zu messende Zellsuspension gut vermischt, eine Probe von 100 µl entnommen und in eine isotone Elektrolytlösung (CASYton) suspendiert. Die Suspension wurde durch eine Messkapillare definierter Geometrie mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit gesaugt. An dieser ist über Platinelektroden ein elektrisches Spannungsfeld angelegt, das durch die elektrolytgefüllte Kapillare definiert war. Beim Durchtritt der Probe durch eine Präzisionsmesspore veränderte sich aufgrund der Isolatorwirkung intakter Zellen der definierte Widerstand der Kapillare. Es wurde ein klassifizierbarer, elektrischer Impuls generiert. Durch die Anzahl der gemessenen Impulse

konnte die Zellzahl der Probe quantifiziert werden. Moderne elektrisch- basierte Zellzählgeräte kombinieren dieses Widerstandsmessprinzip mit dem Verfahren der Pulsflächenanalyse, wobei die jeweilige Pulsfläche, die durch Abtasten mit 1 MHz generiert wird, proportional zum Zellvolumen ist. Auf diese Weise erfolgte neben der Zellzahlbestimmung die Berechnung der durchmesserlinearen Größenverteilung mittels der volumenlinearen Originalverteilung. Je nach Zellgröße wurden individuelle Impulse verursacht, sodass eine Differenzierung verschiedener Zellpopulationen sowie die Abgrenzung vitaler von devitalen Zellen möglich waren.

Die Zellzählungen erfolgten jeweils nach der Trypsinierung bei Aussaat und Ansatz der Kulturansätze und nach Ablauf der jeweiligen Kulturdauer von drei beziehungsweise entsprechend sechs Tagen. Jede Messung wurde dreifach wiederholt. So wurde mit Hilfe der automatisierten Zellzählung jeweils die exakte Anzahl an Zellen bestimmt.

#### **2.8.1.5 Alkalische Phosphatase**

Alle verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen (s. Tabelle im Anhang).

Das verbrauchte Medium wurde vorsichtig von den Zellen in den Wells abgezogen und der Zelllayer mit 600 µl PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 200 µl Lysepuffer pro Vertiefung und Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 60 Minuten. Die Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in 1,5 ml Reagenzgefäße gegeben und bei 1000 U/min zentrifugiert. 100 µl des jeweiligen Überstandes wurden in eine 96-Well-Platte überführt, sofort mit 100 µl der Substratlösung versetzt und im Dunkeln inkubiert. Nach 15 min erfolgte die erste Messung der optischen Dichte (OD) bei 405 nm am Plattenphotometer (Referenzwellenlänge: 650 nm). Hier wurde der Substratumschlag mit Hilfe einer chromogenen Substanz (p-NPP, Para-Nitrophenylphosphat) gemessen. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit wurde der Substratumschlag erneut bestimmt (Gesamtinkubation 30 min). Abhängig von der Farbintensität wurde nach 45 min Gesamtinkubationszeit die OD noch einmal gemessen. Zur Auswertung diente der Mittelwert der jeweiligen OD-Werte nach 15, 30 und 45 Minuten.

#### **2.8.1.6 BCA-Assay**

Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer standardisierten Labormethode mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)- Test (Pierce Thermoscientific) und diente der Gesamtproteinbestimmung für die Berechnung der alkalischen Phosphatase (s. dazu Tabelle im Anhang). Der Nachweis beruht darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Moleküle dieses Komplexes werden zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert und bilden nach Inkubation mit Bicinchoninsäure einen violetten

Farbkomplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde bei 595 nm gemessen. Als Proteinreferenz diente BSA in einer Standardkonzentrationsreihe von 0.025, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 und 2.0 mg/ml. Als Leerkontrolle dienten 20 µl des Lysepuffers mit 200 µl des BCA-Reagenzes.

Dazu wurden an Tag 0 der Aussaat der C2C12-Zellen ebenfalls je 20000 C2C12-Zellen in 4 Vertiefungen einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden für drei Tage unter Mangelmedium (DMEM, *low glucose*, 2% FKS, 2% Gentamycin) im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) neben den Zellen des Versuchsansatzes inkubiert. Bei Ende des Versuchs wurde das verbrauchte Medium entnommen, die Zellen mit 600 µl PBS gewaschen und für 1 Stunde mit Lysepuffer bei RT inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 1000 U/min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden mit 200 µl BCA-Reagenz für 30 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Die Messung erfolgte nach Abkühlen der Probe auf RT innerhalb von 10 min im BioPhotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergab sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden.

Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

$$Umsatz = \frac{OD_{Probe} - OD_{Substrat}}{x \text{ min} * 18,5 * 10^{-3} l * \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1} * 0,62 \text{ cm} * \text{mg}_{Gesamtprotein}}$$

$$[Umsatz] \frac{\mu\text{mol}_{p-NPP}}{\text{min} * \text{mg}_{Gesamtprotein}}$$

## 2.8.2 HUVEC

Die humanen vaskulären Endothelzellen (HUVEC-Zellen oder *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) und die folgenden Materialien zur Kultivierung wurden von der Firma Lonza bezogen (s. Tabelle im Anhang). Die HUVEC-Zellproliferation diente der Kontrolle von intaktem rhVEGF. Das rhVEGF wirkt auf Endothelzellen mitogen und diente somit als Nachweis für die biologisch aktive Form des Proteins (FERRARA et al. 1992).

### 2.8.2.1 Kultivierung

Die humanen vaskulären Endothelzellen wurden als *Cryopresered Cells* in einem Umfang von  $1,5 \times 10^6$  Zellen geliefert. Vor Kultivierung der Zellen wurde die Anzahl der zur Aussaat benötigten Kulturflaschen berechnet. Es wurde eine Aussaatdichte von 4000 Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturflaschenoberfläche verwendet. Die Kulturflaschen wurden mit 1 ml EGM®-2 Medium pro 5 cm<sup>2</sup> Oberfläche befüllt und anschließend für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank für die Aufnahme der Zellen vorbereitet.

Die Cryovials, welche die HUVEC-Zellen enthielten, wurden unter sterilen Bedingungen zur Druckentlastung geöffnet und sofort wieder verschlossen, um danach im 37 °C Wasserbad zügig aufgetaut zu werden. Sobald sich die letzten sichtbaren Eiskristalle aufgelöst hatten, wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad genommen. Die Zellen wurden nun in den Cryovials mittels einer Mikropipette resuspendiert und in die vorbereiteten Kulturflaschen pipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung wurden die Kulturflaschen anschließend vorsichtig geschwenkt. Die mit den HUVEC-Zellen befüllten Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) wurden unter Standardlaborbedingungen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in den Brutschrank gestellt. Es sollten für den gesamten Zellversuch nur Zellen einer Charge verwendet werden, um eventuelle Wachstumsunterschiede der einzelnen Chargen auszuschließen. Aufgrund dessen musste eine für den gesamten Versuchsaufbau ausreichende Menge an Zellen kultiviert werden.

### **2.8.2.2 Mediumwechsel**

Als Kultivierungsmedium für die HUVEC-Zellen wurde EGM-2® der Firma Lonza verwendet. Das Medium wurde am ersten Tag nach der Aussaat und dann im Turnus von 2 Tagen gewechselt. Das Volumen wurde entsprechend der beobachteten Konfluenz der Zellkultur gewählt: 1 ml Medium pro 5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei einer Konfluenz kleiner als 25%, 1,5 ml Medium pro 5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei einer Konfluenz von 25 bis 45% und 2 ml Medium pro 5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei einer Konfluenz von mehr als 45%.

Zum Mediumwechsel wurde das entsprechende Volumen Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Dabei wurde Wert darauf gelegt, immer nur das jeweils benötigte Volumen zu erwärmen, um wiederholtes Erwärmen der gesamten Vorratsflasche und eine etwaige daraus folgende Schädigung des Mediums zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden Aliquots in den entsprechenden Volumina (15 ml) angelegt und bei 4 °C gelagert. Vor jedem Mediumwechsel wurden alle Zellkulturplatten mikroskopisch auf bakterielle und fungizide Kontamination untersucht. Unter sterilen Bedingungen wurde das verbrauchte Medium aus den Kulturflaschen mittels einer an einer Absaugvorrichtung angeschlossenen Pasteurpipette vorsichtig abgezogen. Dabei wurde peinlichst darauf geachtet, eine Verletzung des Zell-Monolayers zu verhindern. Das frische auf 37 °C erwärmte Medium wurde anschließend mit einer Einwegpipette in die Kulturflasche appliziert.

### **2.8.2.3 Subkultivierung**

Die *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* wurden subkultiviert, sobald sie eine Konfluenz von 70 - 80% erreicht hatten, sowie sich Mitosestadien der Zellen in der gesamten Kulturflasche zeigten. Beim Mediumwechsel zeigte sich bei Inspektion mit dem

Phasenkontrastmikroskop, dass kleine Kulturen gewachsen waren. Nach einem Tag des Wachstums zeigte sich bereits eine nahezu ausreichende Dichte an Zellen. Das Medium wurde abgesaugt und durch wachstumsfaktorfreies EGM<sup>®</sup>-2 Medium ersetzt, um die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn zu „verarmen“, damit diese besser auf die Wachstumsfaktorstimulation aus dem Implantatmedium reagieren konnten. Nach zwei Tagen hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 70%, sodass der Proliferationsversuch angesetzt werden konnte.

Nach Absaugen des verbrauchten Mediums unter Vakuum wurde die Kultur mit 5 ml vorgewärmten (37 °C) HEPES-BSS gespült und der Überstand wieder abgesaugt. Es folgte das Bedecken der Kultur mit 2 ml Trypsin/EDTA, welches ebenfalls vorgewärmt (37 °C) wurde. Die Kulturflasche wurde während der Inkubationszeit für 3 - 5 min bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Nach anschließender mikroskopischer Betrachtung der Kultur mussten 90% der Zellen abgerundet sein. Ein kurzes Anschlagen der Kulturflasche, um weitere Zellen zu lösen, konnte je nach Bedarf alle 30 Sekunden wiederholt werden, bis nahezu alle Zellen frei flottieren. Das Neutralisieren des Trypsins erfolgte mit 4 ml *Trypsin Neutralization Solution* (TNS). Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und es folgte die mikroskopische Beurteilung der leeren Kulturflasche. Nur 5% der Ausgangszellen sollten maximal verblieben sein. Die Zellzahlbestimmung und Kontrolle der Vitalität fand mit Hilfe des Zellzählgerätes (CASY) statt. Die in der Suspension vorhandenen Zellen wurden zentrifugiert (5 min bei 220x g) und der Überstand bis auf 100 - 200 µl dekantiert. Es folgte das Resuspendieren der Zellen mit Medium (EGM-2<sup>®</sup> + VEGF-A) auf  $3 \times 10^5$  Zellen/ml, sodass je 100 µl mit je 30000 Zellen in eines der mit 1 ml Medium (EGM-2<sup>®</sup> + VEGF-A) befüllten Kammern einer 24-Well-Platte eingesät werden konnten. Die Mehrwellplatten wurden für 4 Stunden in den Inkubator bei Standardbedingungen gestellt. Die restlichen 1,2 Mio. Zellen wurden je 400000 Zellen in reinem FKS mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) eingefroren. Sie wurden direkt nach dem Aliquotieren auf Eis gestellt, danach in einen *Cryo Freezing Container* gegeben. Dieser kühlte die Proben in 1 °C - Schritten auf die gewünschte Temperatur langsam herunter. Zur Lagerung wurden die Zellen in einen -80 °C Tiefkühlschrank gestellt.

#### **2.8.2.4 Proliferationsassay**

Als Nachweis der biologischen Aktivität des freigesetzten rhVEGF<sub>165</sub> diente der Proliferationsassay der HUVEC-Zellen. Im Anschluss an die 4 Stunden Anheftungszeit wurde der Prozess mikroskopisch kontrolliert. Es folgten das Abnehmen des Mediums aus den jeweiligen Kammern der Multiwellplatte und ein Waschvorgang mit 500 µl HEPES-BSS. Es erfolgte die Zugabe von 750 µl des EGM-2<sup>®</sup> Mediums der Gruppen 2

und 3- VEGF des vorhergegangenen Releaseversuchs. Hierbei wurde das Medium von fünf verschiedenen, für den Verlauf charakteristischen Zeitpunkten des Releaseversuchs ausgewählt. Nach täglicher Kontrolle unter dem Mikroskop fand an Tag 3 ein Mediumwechsel statt. Das verbrauchte Medium wurde vorsichtig abgezogen, ohne den Zelllayer zu zerstören und verworfen. Im Anschluss wurden erneut 750 µl des Releasemediums auf die Zellen gegeben. Nach weiteren drei Tagen der Inkubation unter Standardlaborbedingungen und täglicher mikroskopischer Wachstumskontrolle wurde der Versuch beendet, indem die Zellen nach dem oben beschriebenen Protokoll trypsiniert wurden. Im Anschluss daran wurde mittels Zellzählgerät (CASY) die Zellzahl und Vitalität bestimmt, um Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des rhVEGF-A<sub>165</sub> der Proben zu ermitteln. Die Proliferation der HUVEC-Zellen, die mit Releasemedium von beladenen Implantaten behandelt wurden, stand im Vergleich zur Proliferation von denjenigen Zellen, die mit Medium von Implantaten ohne rhVEGF<sub>165</sub> behandelt wurden (Kontrollgruppe). Die Angabe des Wachstums der Zellen erfolgte in der Auswertung der biologischen Aktivität des rhVEGF-A<sub>165</sub> in Prozent zur Kontrollgruppe.

## 2.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Hauptversuche wurde die Software SAS Version 9.3 verwendet. Deskriptive Merkmale und Grafiken wurden mit STATISTICA Version 10.0 erstellt.

Die Auswertungen der Elisa-Versuche sowie die der biologischen Aktivität des rhVEGF<sub>165</sub> erfolgten mit der Zwei-faktoriellen ANOVA (Varianzanalyse), wobei der Faktor Zeit sowie der Faktor Konzentration als abhängige Variablen modelliert wurden. Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die Versuche wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Einzelmessungen der jeweils unabhängigen Stichproben herangezogen.

Die kumulierten Gesamtrelease-Werte bis zum Zeitpunkt 648 Stunden der Implantate wurden in Relation zu der möglichen Freisetzungsmenge des Implantats anhand der Release-Ergebnisse ermittelt.

Die Auswertung der biologischen Aktivität des rhBMP-2 durch die alkalische Phosphatase erfolgte rein deskriptiv, da die Stichprobenanzahl für die statistische Auswertung als zu gering angesehen wurde.

Dabei wurde die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem Signifikanzniveau  $\alpha = \leq 0,05$  festgelegt. Diesbezüglich ging es um einen p-Wert, welcher kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau war, eine statistische Signifikanz zum Niveau  $\alpha$  hervor (BENDER und LANGE 2007). P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden als signifikant bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumsfaktorfreisetzung

##### 3.1.1 rhBMP-2-Release

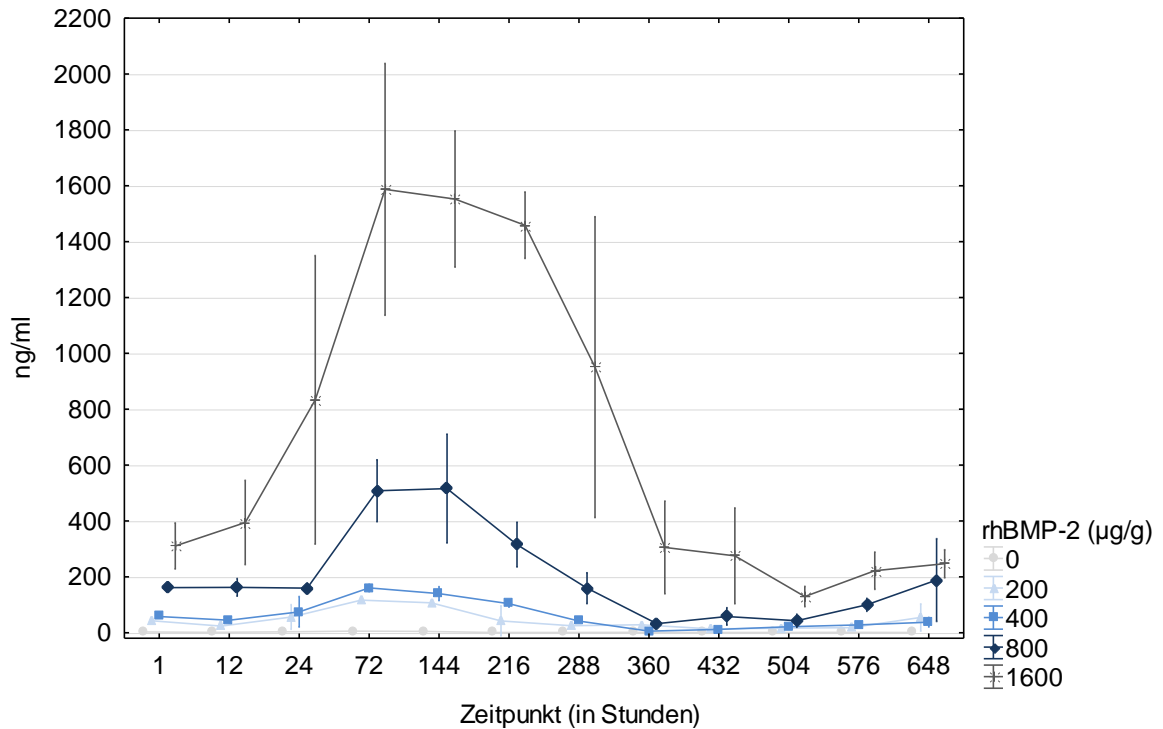


Abbildung 8: rhBMP-2- Gesamtrelease der mit rhBMP-2 beladenen Implantate (Gruppe 1).

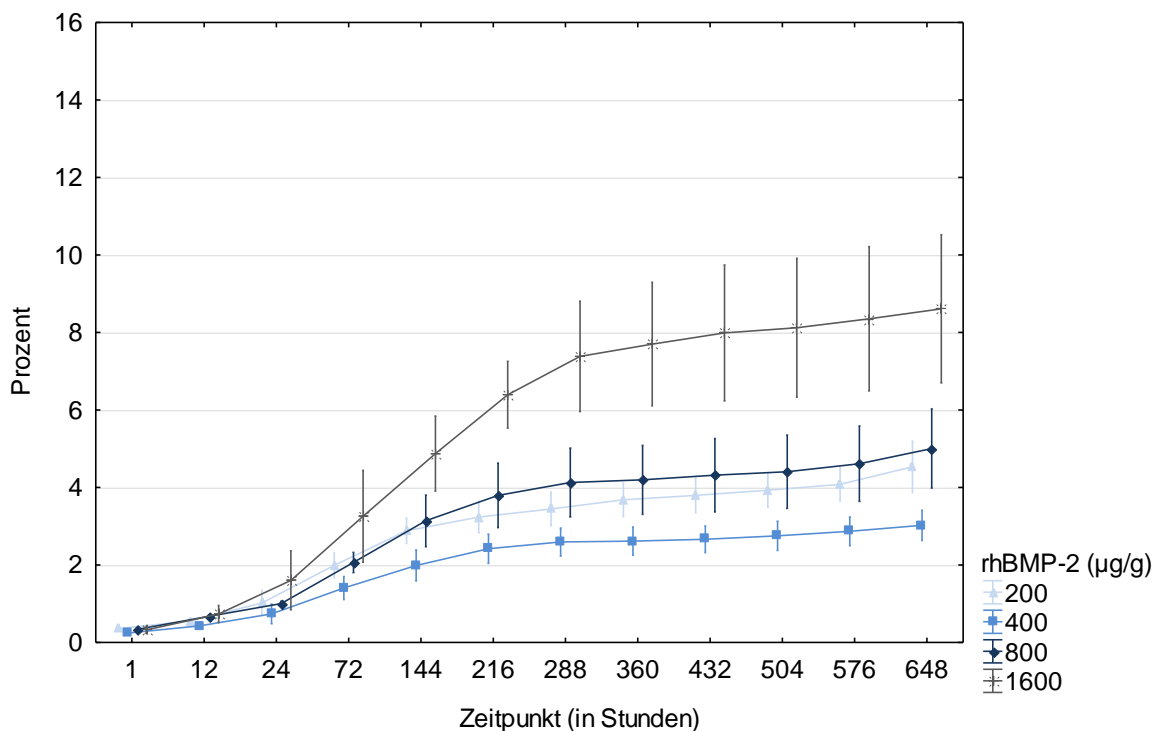
Ergebnisse des BMP-ELISA in ng/ml. Angaben zu den jeweiligen Zeitpunkten (Stunden) nach Versuchsansatz.

Implantate, welche mit rhBMP-2 allein beladen worden waren, zeigten eine konzentrationsabhängige Freisetzung mit einer maximalen Freisetzung von 1587,1 ng/ml der höchsten Dosisgruppe (1600 µg/g rhBMP-2) und einer minimalen Menge von 5,7 ng/ml in der Dosisgruppe mit 400 µg/g rhBMP-2. Alle Konzentrationen zeigten ein ähnliches Freisetzungsmuster, jedoch auf einem unterschiedlichen Niveau. Die Freisetzung des rhBMP-2 stieg in den ersten 3 Tagen auf ein maximales Freisetzungsniveau an, verblieb auf diesem Freisetzungsspeak etwa 1 Woche, um darauffolgend für etwa 1 Woche stetig zu sinken. Bis zum Ende der Beobachtungszeit verblieb das Freisetzungsniveau auf dem niedrigen Level. Zum Ende der Beobachtungszeit zeigte sich ein geringfügiger Anstieg. Dieses Phänomen ist umso geringer ausgeprägt, je weniger die Implantate mit BMP-2 beladen worden waren.

**Tabelle 3: Mittlere Freisetzungselevel des rhBMP-2 über den gesamten Verlauf (Gruppe 1).**

Konzentration	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)
200 µg/g rhBMP-2	45,33	39,00
400 µg/g rhBMP-2	60,48	51,01
800 µg/g rhBMP-2	200,24	174,27
1600 µg/g rhBMP-2	688,83	594,85
Kontrolle	1,92	1,80

Der Verlauf über den gesamten Beobachtungszeitraum unterscheidet sich zwischen der 200 µg/g rhBMP-2 und 400 µg/g rhBMP-2 Dosisgruppe nicht signifikant ( $p = 0.1692$ ), der 400 µg/g rhBMP-2 und 800 µg/g rhBMP-2 Dosisgruppe signifikant ( $p = 0.0022$ ) sowie der 800 µg/g rhBMP-2 und der von 1600 µg/g rhBMP-2 Dosisgruppe signifikant ( $p = 0.0001$ ). Der Verlauf von 400 µg/g rhBMP-2, 800 µg/g rhBMP-2 und 1600 µg/g rhBMP-2 unterscheidet sich zu den Zeitpunkten zwischen 24 Std und 288 Std nicht signifikant ( $p = 0.2$ ).

**Abbildung 9: Kumulierter Release in Prozent (Gruppe 1).**

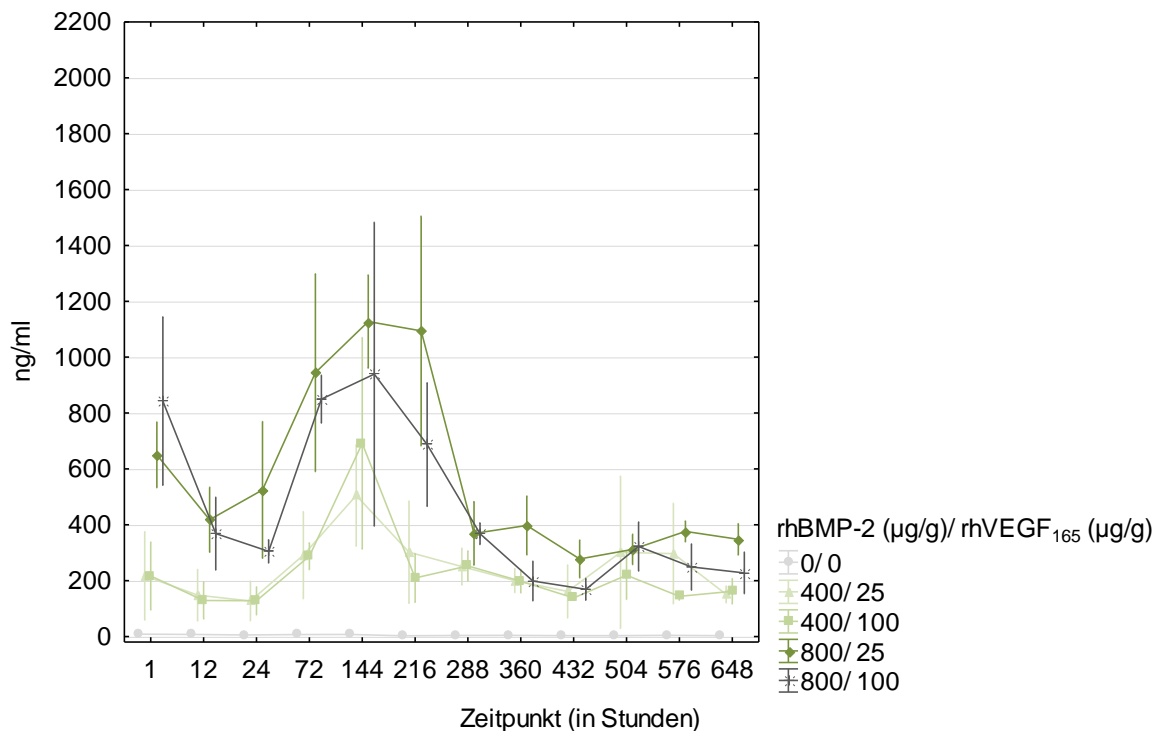
Die Prozentzahl ergibt sich in Bezug auf die mögliche Gesamtfreisetzung der verschiedenen Konzentrationen.

Während der gesamten Beobachtungszeit sind Mengen zwischen 8,6% und 3,0% der anfänglich in die Implantate inkorporierten Menge des rhBMP-2 freigesetzt worden. Dies geschah in einem sättigungsförmigen Verlauf, wobei der höchste Anstieg zwischen Tag 3



und Tag 9 stattfand. Bis zu Tag 1 gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0.1373$ ) in der Menge des bis dahin freigesetzten rhBMP-2 in Bezug auf die anfänglich in die Implantate inkorporierten rhBMP-2 Menge. Die Dosisgruppe mit 1600  $\mu\text{g/g}$  rhBMP-2 setzte signifikant mehr rhBMP-2 frei als jede andere Gruppe (im Vergleich zu 800  $\mu\text{g/g}$  rhBMP-2  $p = 0.0003$ ,  $p = <0.0001$  für die 400 $\mu\text{g/g}$  rhBMP-2,  $p = <0.0001$  für die 200  $\mu\text{g/g}$  rhBMP-2 Gruppe).

### 3.1.2 rhBMP-2-Release der Kombinationsimplantate



**Abbildung 10: rhBMP-2-Gesamtrelease der mit rhBMP-2 und rhVEGF<sub>165</sub> beladenen Implantate (Gruppe 3- BMP).**

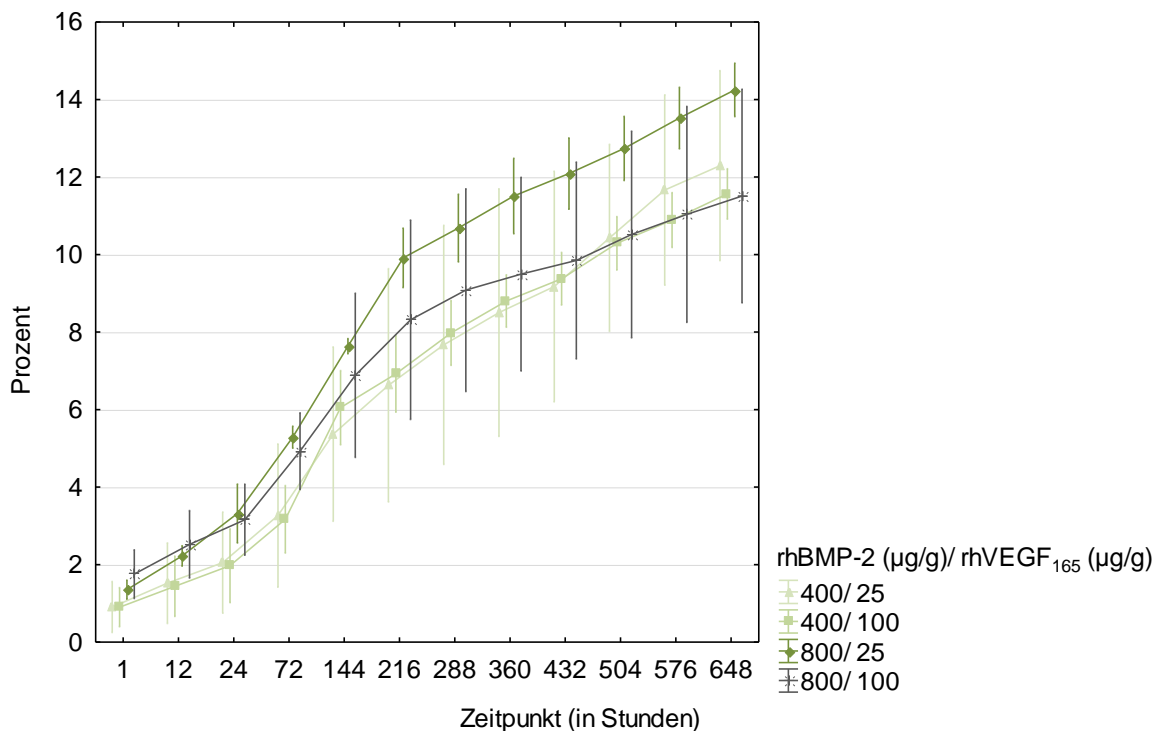
**Ergebnisse des BMP- ELISA in ng/ml. Angaben zu den jeweiligen Zeitpunkten (Stunden) nach Versuchsansatz.**

Die Freisetzungskinetik der Implantate beider Wachstumsfaktoren (Gruppe 3- BMP) aus den Implantaten unterschied sich nur wenig in Bezug auf das rhBMP-2. Es wurde jedoch zu Beginn der Beobachtungszeit in einer schlagartigen Kinetik mit höheren Mengen an rhBMP-2 freigesetzt im Vergleich zu den entsprechenden Implantaten, die mit 400  $\mu\text{g/g}$  und 800  $\mu\text{g/g}$  rhBMP-2 alleine beladen wurden. Der nachfolgende Verlauf der rhBMP-2-Freisetzungen war ähnlich dem der Gruppe 1 (Abbildung 8), obgleich auf einem durchschnittlich höheren Niveau.

**Tabelle 4: Mittlere Freisetzungselevel des rhBMP-2 über den gesamten Verlauf (Gruppe 3- BMP).**

Konzentration	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)
400 µg/g rhBMP-2 / 25 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	245,88	157,04
400 µg/g rhBMP-2 / 100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	231,328	181,78
800 µg/g rh BMP-2 / 25 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	569,93	341,66
800 µg/g rh BMP-2 / 100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	460,46	322,92
Kontrolle	4,89	3,35

Es wurde ein maximaler Freisetzungswert von 1127,6 ng/ml zum Zeitpunkt 144 Std in der Dosisgruppe 800 µg/g rhBMP-2 und 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> erreicht. Die Freisetzungskinetik über die gesamte Beobachtungszeit der Implantate mit 400 µg/g rhBMP-2 und 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> unterschied sich nicht signifikant von denen, die mit zusätzlich 100µg/g rhVEGF<sub>165</sub> beladen worden waren ( $p= 0.6006$ ). Ebenfalls unterschieden sich die Implantate, die mit 800 µg/g rhBMP-2 und den entsprechenden Mengen rhVEGF<sub>165</sub> beladen worden waren, über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant voneinander ( $p= 0.2873$ ).

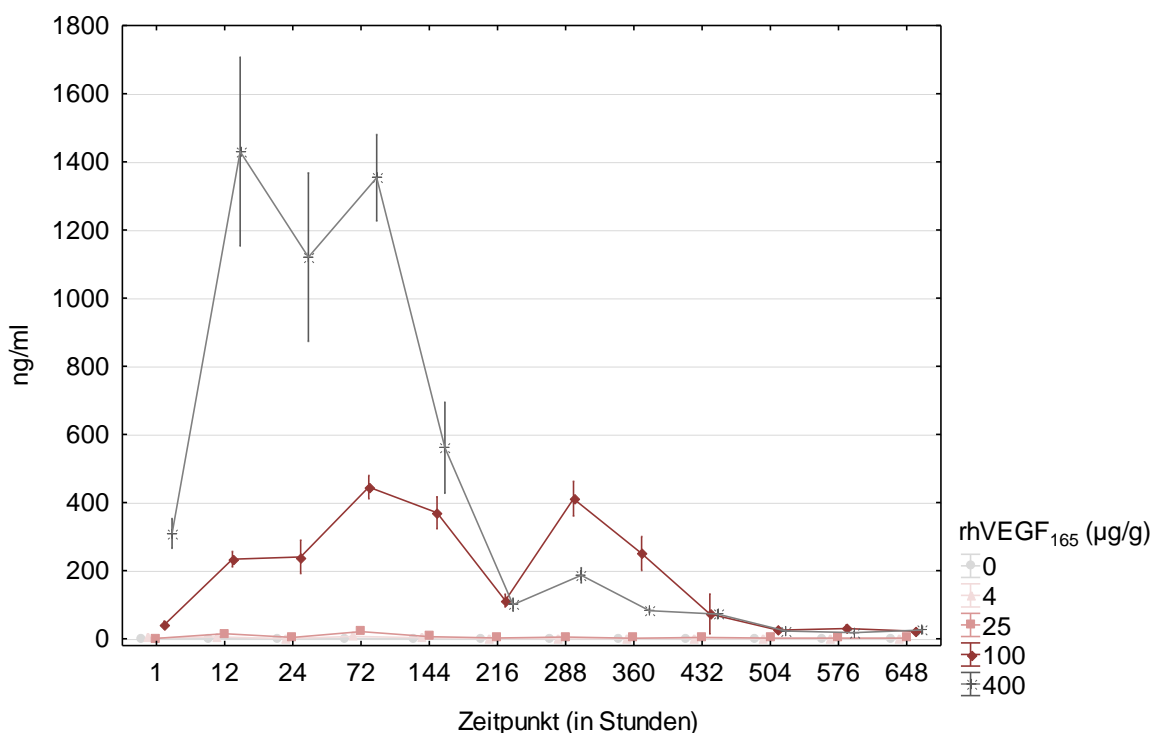
**Abbildung 11: Kumulierter Release in Prozent (Gruppe 3- BMP).**

Die Prozentzahl ergibt sich in Bezug auf die mögliche Gesamtfreisetzung der verschiedenen Konzentrationen.

Es wurde aus den Implantaten zwischen 11,5% und 14,2% der ursprünglich in die Implantate inkorporierten Menge an rhBMP-2 bis zum Zeitpunkt 648 Std freigesetzt. Auffällig ist, dass die Implantate, welche zusätzlich mit der niedrigeren Menge an

rhVEGF<sub>165</sub> (25 µg/g) beladen worden waren, jeweils höhere Mengen an rhBMP-2 über den Beobachtungszeitraum freigesetzt haben (12, 3% 400 µg/g rhBMP-2 und 14,2% bei 800 µg/g rhBMP-2) (siehe dazu ebenfalls Tabelle 4)) im Vergleich zu den entsprechenden Implantaten in Verbindung mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> (11,6% 400 µg/g rhBMP-2 und 11,5% bei 800 µg/g rhBMP-2). Der Verlauf ähnelt dem Verlauf der Gruppe 1. Im Vergleich zur Gruppe 1 liegen die Werte um 7,9% bei der Dosisgruppe mit 800 µg/g rhBMP-2 und 8,9% bei der Dosisgruppe mit 400 µg/g rhBMP-2 höher (vgl. Abbildung 9).

### 3.1.3 rhVEGF<sub>165</sub>-Release



**Abbildung 12: rhVEGF<sub>165</sub>- Gesamtrelease der mit rhVEGF<sub>165</sub> beladenen Implantate (Gruppe 2).**

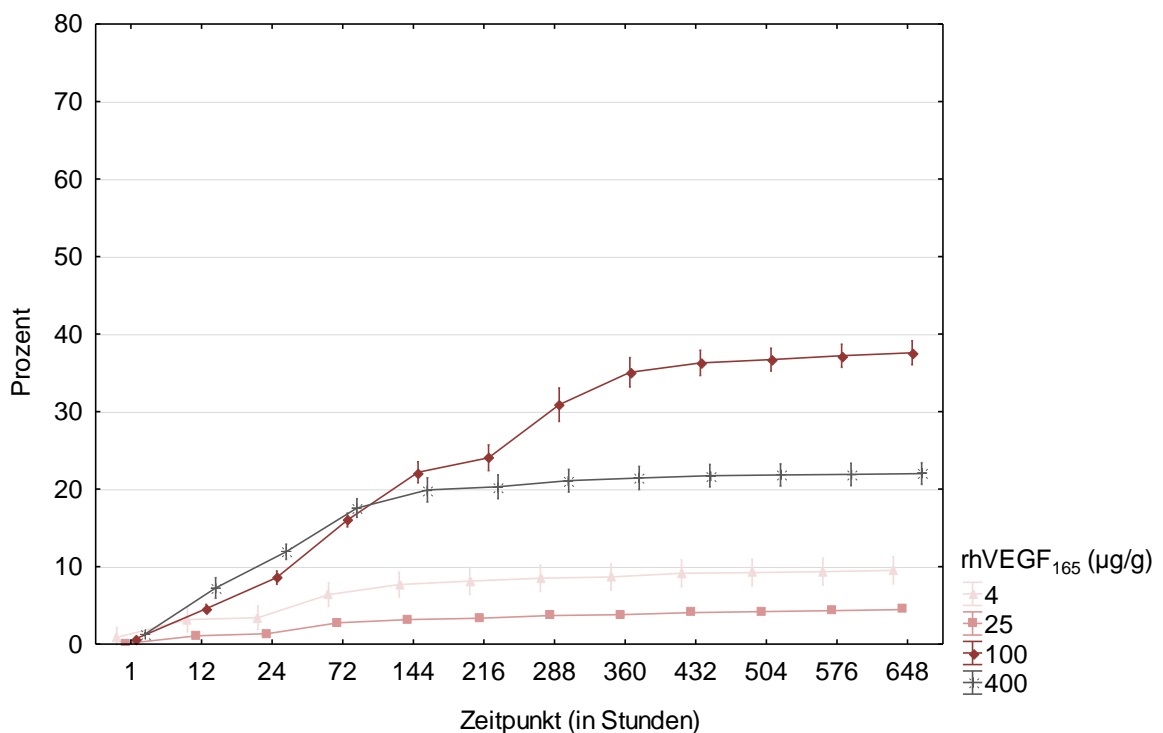
**Ergebnisse des VEGF- ELISA in ng/ml. Angaben zu den jeweiligen Zeitpunkten (Stunden) nach Versuchsansatz.**

Aus den Implantaten der Dosisgruppe 400 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> löste sich innerhalb der ersten 12 Stunden die Maximalmenge von 1429,29 ng/ml rhVEGF<sub>165</sub>. Für weitere 3 Tage verblieb die Freisetzung des rhVEGF<sub>165</sub>s auf einem etwa gleichbleibenden Level, im Mittel von 1301,16 ng/ml und fiel in der Folge für etwa 1 Woche auf ein relativ niedriges Niveau von 72,64 ng/ml. Im Vergleich dazu setzten die Implantate, die mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> beladen worden waren, das rhVEGF<sub>165</sub> in einem ähnlichen Muster frei, wohingegen die niedrige Dosisgruppe (4 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>) nur Mengen an rhVEGF<sub>165</sub> freisetzte, die nahe denen der Kontrollgruppe lagen (Tabelle 5) und damit nahe über dem detektierbaren Mengen des Testsystems. Der Gesamtverlauf jeder rhVEGF<sub>165</sub>- Konzentration

unterschied sich im Gesamtverlauf jeweils signifikant von dem der Kontrollgruppe ( $p < .0001$ ). Das Freisetzungsmuster unterschied sich unabhängig von der rhVEGF<sub>165</sub> Konzentration gegen Ende des Versuchs, zwischen Zeitpunkt 432 Stunden und 648 Stunden, nicht signifikant voneinander ( $p = 0.1070$ ). Die Dosisgruppe 400 µg/g setzte signifikant mehr rhVEGF<sub>165</sub> frei als die zwei niedrigsten Vergleichsgruppen (25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>:  $p = 0.0129$ , 4 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>:  $p = 0.0011$ ), jedoch nicht signifikant mehr als die Dosisgruppe 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> ( $p = 0.079$ ).

**Tabelle 5: Mittlere Freisetzungselevel des rhVEGF<sub>165</sub> über den gesamten Verlauf (Gruppe 2).**

Konzentration	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)
4 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	1,90	2,51
25 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	5,57	6,08
100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	187,92	156,99
400 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	440,17	539,13
Kontrolle	0,33	0,33



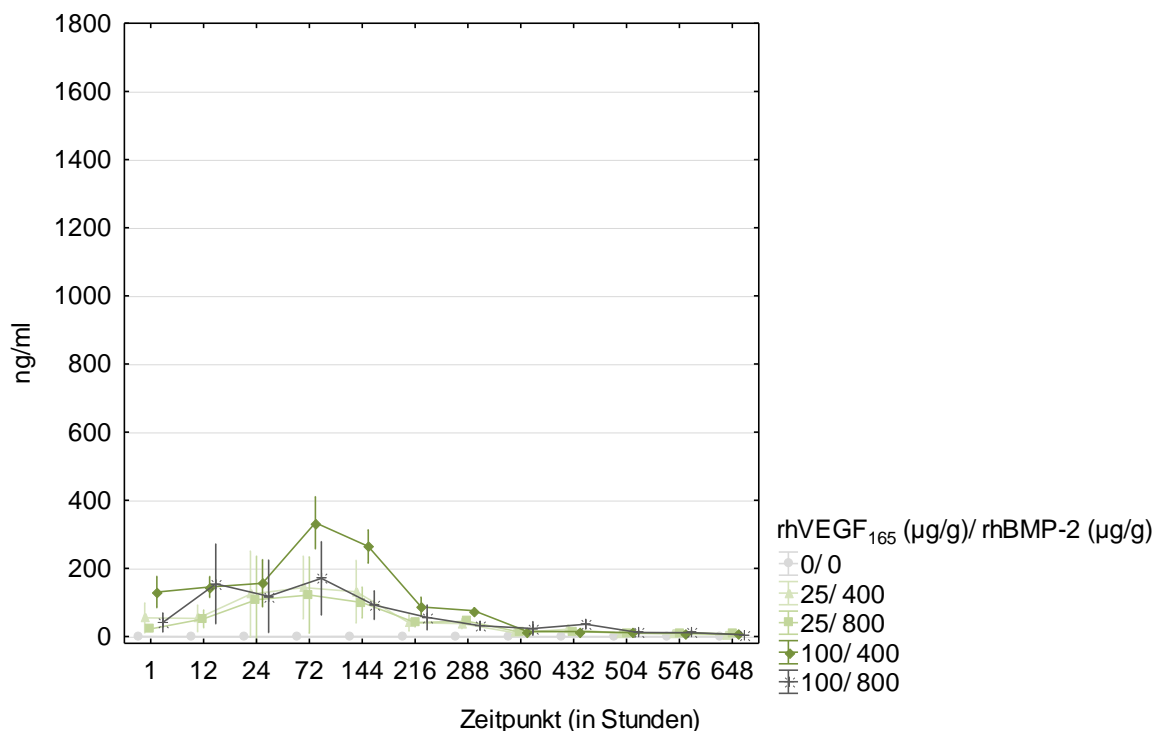
**Abbildung 13: Kumulierter Release in Prozent (Gruppe 2).**

Die Prozentzahl ergibt sich in Bezug auf die mögliche Gesamtfreisetzung der verschiedenen Konzentrationen.

Die Implantate jeder Konzentration setzten das rhVEGF<sub>165</sub> in Form einer Sättigungskurve frei, in Bezug auf die Gesamtmenge des in den Implantaten enthaltenen

Wachstumsfaktors rhVEGF<sub>165</sub>. Der Anstieg der Freisetzungsmenge der Implantate 400 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> ist bis zum dritten Tag am größten, geht dann jedoch in die Sättigungsphase über mit einer Gesamtfreisetzung von 22,0% bis zum Ende der Beobachtungszeit. Im Gegensatz dazu setzten die Implantate der 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Dosisgruppe bis zum Zeitpunkt 360 Std, nachdem die Implantate in Lösung gelegt worden sind, ansteigend rhVEGF<sub>165</sub> frei und erst dann folgt der Übergang in ein Sättigungsverhalten, sodass bis zum Ende der Beobachtungszeit 37,6% der Gesamtmenge freigesetzt wurden. Im Unterschied dazu setzten die Implantate der Gruppen mit niedrigem rhVEGF<sub>165</sub>-Gehalt Mengen zwischen 4,5% (25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>) und 9,5% (4 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>) im Verlauf der Versuche frei.

### 3.1.4 rhVEGF<sub>165</sub>-Release der Kombinationsimplantate



**Abbildung 14: rhVEGF<sub>165</sub>- Gesamtrelease der mit rhVEGF<sub>165</sub> und rhBMP-2 beladenen Implantate (Gruppe 3-VEGF).**

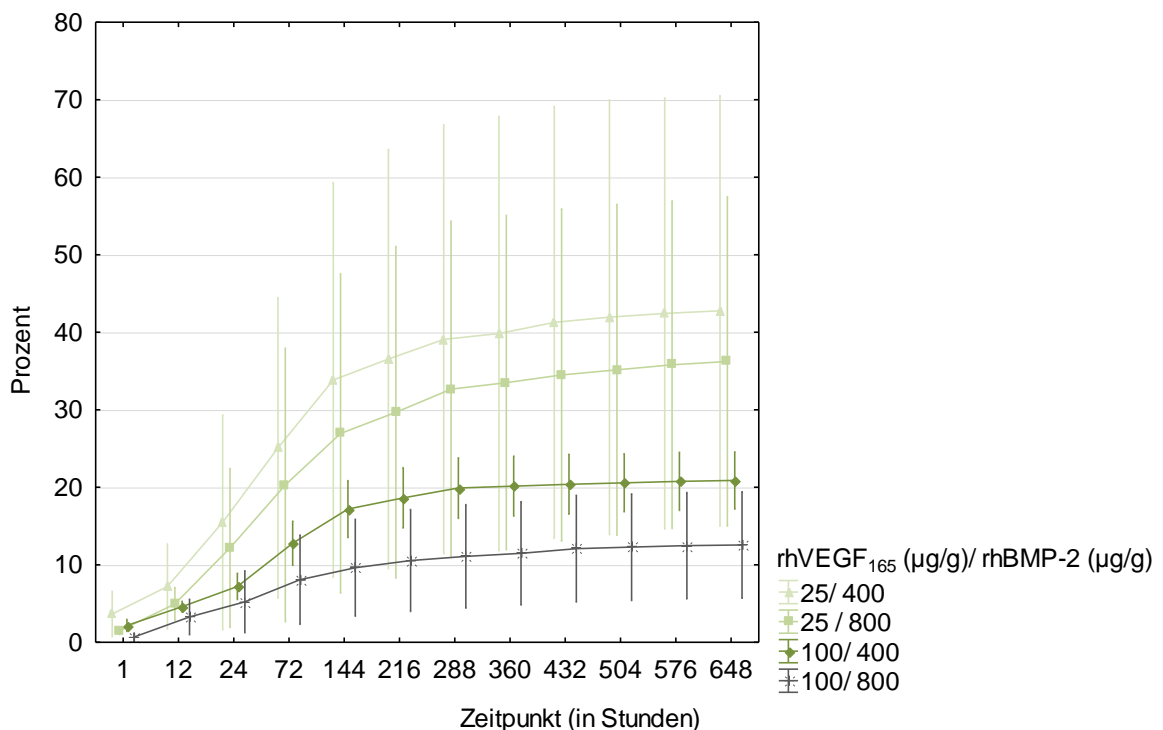
**Ergebnisse des VEGF- ELISA in ng/ml. Angaben zu den jeweiligen Zeitpunkten (Stunden) nach Versuchsansatz.**

Die rhVEGF<sub>165</sub> Freisetzung der Implantate der Gruppe 3- VEGF zeigten einen sehr frühen Anstieg während der ersten drei Tage und einen darauffolgenden Rückgang der Freisetzung in der folgenden Woche, ähnlich dem Freisetzungsmuster der Implantate, welche mit rhVEGF<sub>165</sub> allein beladen waren. Auffällig ist, dass die Implantate der

Dosisgruppe mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> in Kombination mit 400 µg/g rhBMP-2 signifikant größere Mengen bereits zu den frühen Zeitpunkten freisetzen ( $p= 0.0372$ ) im Vergleich zu den Implantaten, welche mit zusätzlich mit 800 µg/g rhBMP-2 beladen worden waren. Die maximale Freisetzung ergab 334,21 ng/ml zum Zeitpunkt 72 Std für die mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> in Kombination mit 400 µg/g rhBMP-2 beladenen Implantate. Vergleicht man die Implantate der beiden niedrigeren rhVEGF<sub>165</sub> Konzentrationen (25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> in Kombination mit 400 µg/g rhBMP-2 bzw. 800 µg/g rhBMP-2), so ergibt sich über den gesamten Beobachtungsverlauf kein signifikanter Unterschied in der Freisetzung des rhVEGF<sub>165</sub> ( $p= 0.7627$ ).

**Tabelle 6: Mittlere Freisetzungsniveaus des rhVEGF<sub>165</sub> über den gesamten Verlauf (Gruppe 3- VEGF).**

Konzentration	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)
25 µg/g rhVEGF <sub>165</sub> / 400 µg/g rhBMP-2	53,46	67,76
25 µg/g rhVEGF <sub>165</sub> / 800 µg/g rhBMP-2	45,29	58,95
100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub> / 400 µg/g rhBMP-2	104,41	109,06
100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub> / 800 µg/g rhBMP-2	62,78	73,78
Kontrolle	0,15	0,13



**Abbildung 15: Kumulierter Release in Prozent (Gruppe 3- VEGF).**

Die Prozentzahl ergibt sich in Bezug auf die mögliche Gesamtfreisetzung der verschiedenen Konzentrationen.

Bei der Auswertung der prozentual aus den Implantaten freigesetzten Menge des rhVEGF<sub>165</sub> konnte festgestellt werden, dass die Implantate mit der niedrigen rhVEGF<sub>165</sub> Konzentration (25 µg/g) zum Ende der Beobachtungszeit bei 42,8% beziehungsweise 36,2% und damit im Mittel um 22,8% höher als bei den Implantaten mit der hohen rhVEGF<sub>165</sub> Konzentration (100 µg/g) waren. Weiterhin auffällig war, dass jeweils die niedrigere zugefügte Menge des rhBMP-2 zu höheren Werten bei der Gesamtfreisetzung führte (s. Tabelle 6).

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Gruppe mit Implantaten, die mit rhVEGF<sub>165</sub> alleine beladen worden waren (Gruppe 2), ergibt sich ein inhomogener Effekt. Im Gegensatz zur Kombination war hier die Gruppe mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> mit der höchsten freigesetzten Menge (37,6%) und im Gegensatz dazu, die Gruppe mit 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> die mit der niedrigsten prozentualen Freisetzung (4,5%), der bei der Herstellung in die Implantate gegebenen Menge.

## 3.2 Biologische Aktivität

### 3.2.1 Alkalische Phosphatase

#### 3.2.1.1 rhBMP-2-Implantate

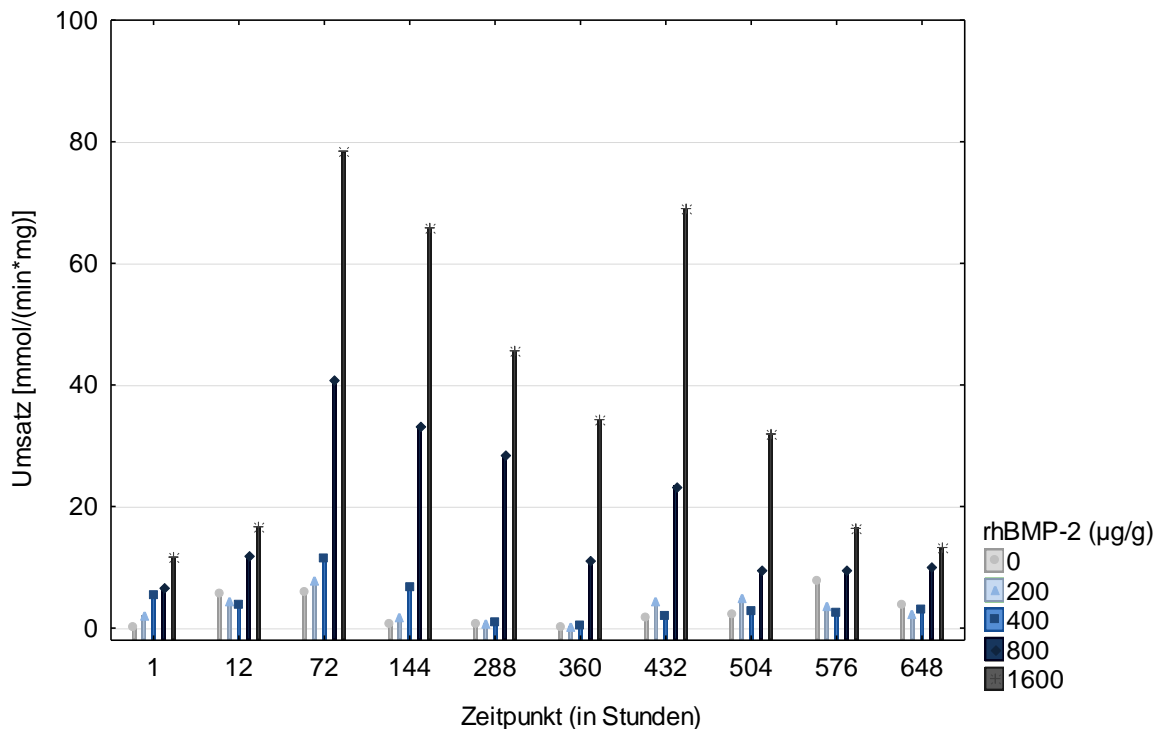


Abbildung 16: Alkalische Phosphatase-Aktivität der C2C12-Zellen (Gruppe 1).

Auswertung nach 3 Tagen Inkubation der Gabe des Gesamtreleasemediums der Implantate mit rhBMP-2 (Gruppe 1).

Die Bewertung der biologischen Aktivität des aus den Implantaten freigesetzten rhBMP-2 zeigte, dass der osteogene Wachstumsfaktor in der Lage war, bis zum Ende der Beobachtungsperiode die Produktion der alkalischen Phosphatase (AP) zu induzieren (Abbildung 16). Die vom Faktor rhBMP-2 allein induzierte Aktivität war eng mit der Menge an freigesetztem Wachstumsfaktor zu den gewählten Zeitpunkten assoziiert (Abbildung 8). Besonders deutlich ist dies in den Gruppen mit 1600 µg/g rhBMP-2 und 800 µg/g rhBMP-2, wobei der Zeitpunkt 432 Std eine Ausnahme bildet.



Tabelle 7: Mittlere AP Bildung der C2C12-Zellen (Gruppe 1).

Ergebnisse nach Behandlung mit rhBMP-2 Releasemediums für 3 Tage über den gesamten Verlauf (Gruppe 1).

Konzentration	Mittelwert (mmol/(min*mg))	Standardabweichung (mmol/(min*mg))
200 µg/g rhBMP-2	3,17	2,24
400 µg/g rhBMP-2	3,87	3,27
800 µg/g rhBMP-2	18,51	12,06
1600 µg/g rhBMP-2	38,31	25,19
Kontrolle	2,81	2,78

Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigte sich eine konzentrationsabhängige Bildung der AP. Eine statistische Auswertung war wegen der geringen Stichprobenanzahl nicht möglich.

### 3.2.1.2 Kombinationsimplantate

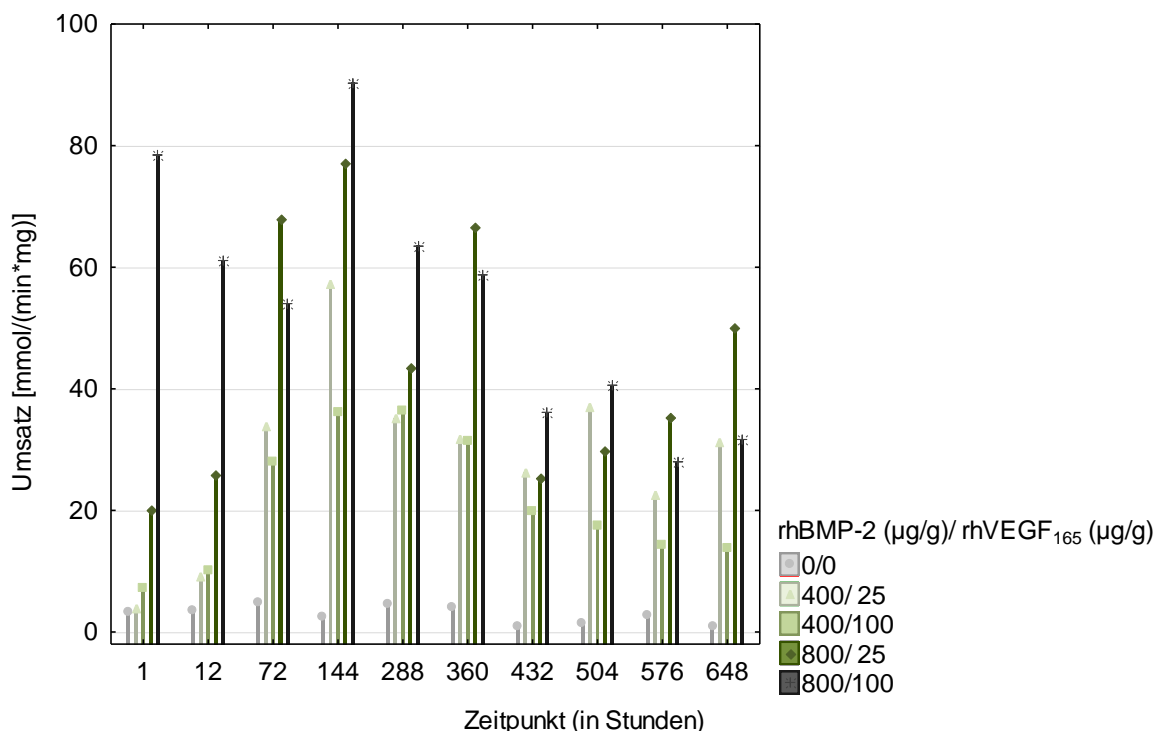


Abbildung 17: Alkalische Phosphatase-Aktivität der C2C12-Zellen (Gruppe 3- BMP).

Auswertung nach 3 Tagen Inkubation der Gabe des Gesamtreleasemediums der Implantate mit rhBMP-2 (Gruppe 3- BMP).

Die kombinierte Freisetzung beider Faktoren ergab einen bemerkenswerten Effekt in Bezug auf die osteogene Aktivität. Im Durchschnitt erreichte die 400 µg/ml rhBMP-2 Konzentrationsgruppe, unabhängig von der rhVEGF<sub>165</sub>-Menge, einen Umsatz von 25,10 mmol/(min\*mg), die Dosisgruppe mit 800 µg/ml rhBMP-2 einen etwa doppelt so hohen Umsatz von 49,23 mmol/(min\*mg) (Tabelle 7 und Tabelle 8). Im Vergleich zu den Ergebnissen der Implantate der Gruppe 1, die alleinig rhBMP-2 enthielt, ergab sich im Durchschnitt ein etwa sechsfach (6,48) höherer Wert in der 400 µg/g rhBMP-2 Konzentrationsgruppe und ein etwa dreifach (2,66) höherer Wert in der Konzentrationsgruppe mit 800 µg/ml rhBMP-2. Die Wirksamkeit des freigesetzten rhBMP-2 scheint in der Kombinationsgruppe (Gruppe 3- BMP) höher zu sein, als das Durchschnittslevel der induzierten alkalischen Phosphatase der mit rhBMP-2 allein beladenen Implantate (11,19 mmol/(min\*mg) der Gruppe 1 im Unterschied zu 37,16 mmol/(min\*mg) der Gruppe 3- BMP). Die Menge des rhVEGF<sub>165</sub> führte zu inkonsistenten Ergebnissen: in der 400 µg/g rhBMP-2 Gruppe führte die niedrigere Menge an inkorporiertem rhVEGF<sub>165</sub> zu verbesserten Ergebnissen, in der 800 µg/g rhBMP-2 Gruppe jedoch zu niedrigeren Mengen alkalischer Phosphatase.

**Tabelle 8: Mittlere AP Bildung der C2C12-Zellen (Gruppe 3- BMP).**

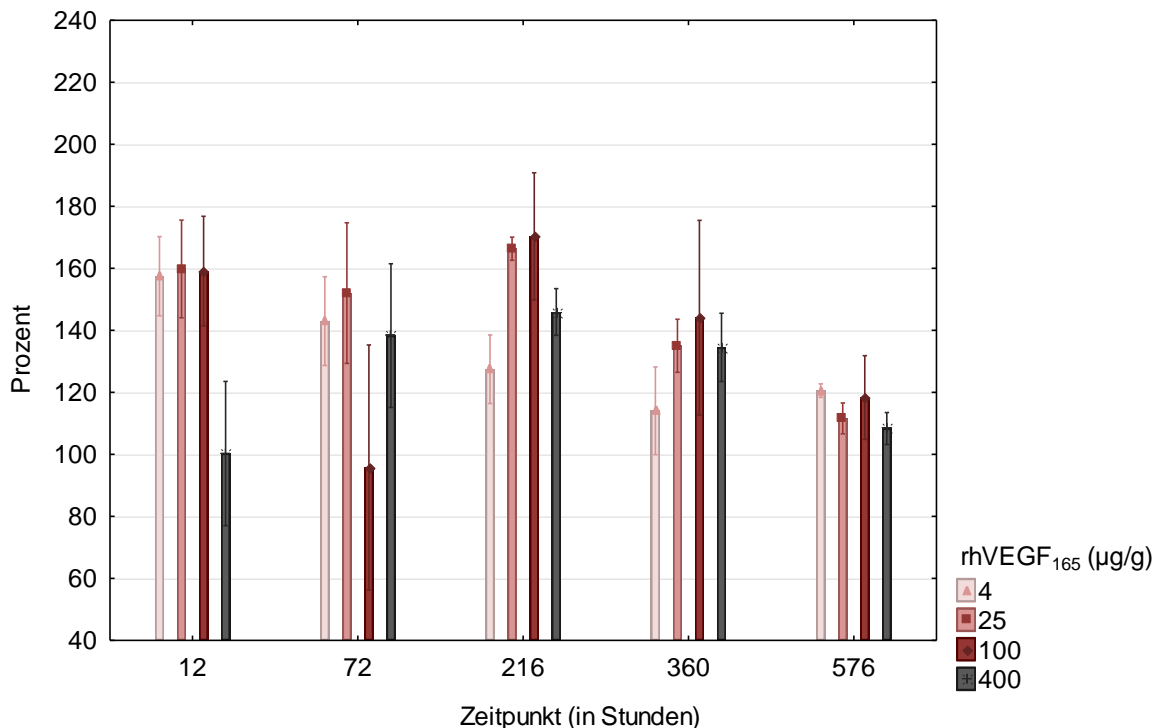
**Ergebnisse nach Behandlung mit rhBMP-2 Releasemediums für 3 Tage über den gesamten Verlauf (Gruppe 3- BMP).**

Konzentration	Mittelwert (mmol/(min*mg))	Standardabweichung (mmol/(min*mg))
400µg/g rhBMP-2 / 25µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	28,75	14,95
400µg/g rhBMP-2 / 100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	21,45	10,70
800 µg/g rh BMP-2 / 25µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	44,21	20,41
800 µg/g rh BMP-2 / 100 µg/g rhVEGF <sub>165</sub>	54,24	20,446
Kontrolle	2,91	1,41

Eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Stichprobenanzahl nicht möglich. Dennoch sollten die Ergebnisse in die Bewertung einbezogen werden.

### 3.2.2 HUVEC-Proliferation

#### 3.2.2.1 rhVEGF<sub>165</sub>- Implantate

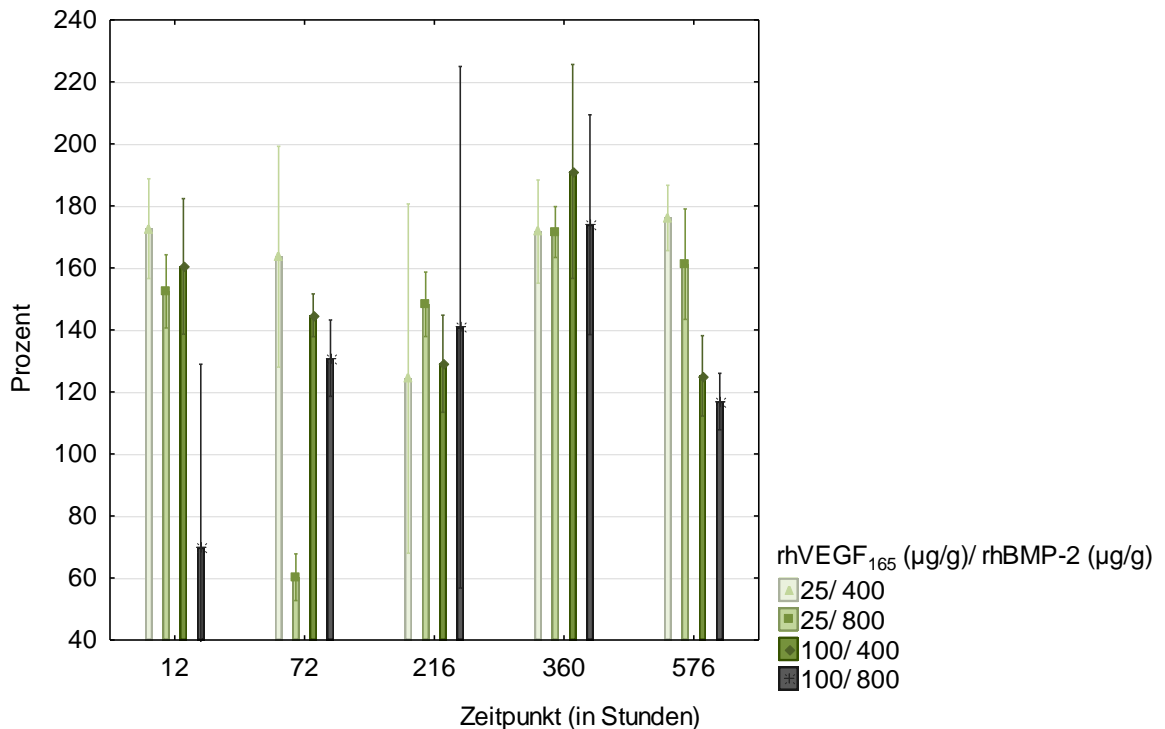


**Abbildung 18: HUVEC-Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit rhVEGF<sub>165</sub>-Releasemedium (Gruppe 2).**

**Gabe des Mediums von ausgewählten Zeitpunkten des Releaseversuchs der Implantate Gruppe 2 – ausgegeben in Prozent zur Kontrolle der jeweiligen Zeitpunkte.**

Die Analyse der HUVEC-Zellproliferation zeigte, dass bei der Zellproliferation zu jedem Zeitpunkt und in jeder Konzentration ein überlegenes Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte (Abbildung 18). Ausnahme bildet der Zeitpunkt 72 Std in der Konzentrationsgruppe 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>. Insgesamt konnte eine Erhöhung der Zellzahl auf bis zu 170,31% zum Zeitpunkt 216 Std erreicht werden, welcher den im Durchschnitt proliferationsstärksten Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellte (152,51%). Vergleicht man die Konzentrationsgruppen untereinander, so ergibt sich, dass die mit 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> beladenen Implantate im Mittel 44,46% oberhalb der Kontrolle lagen. Die Zellpopulationen, denen Medium aus der 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Implantatgruppe zugeführt wurde, erreichte durchschnittlich Zellzahlen, welche 38,89% oberhalb der Kontrollgruppe lagen. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb des Versuchs festgestellt werden ( $p = 0.0954$ ).

### 3.2.2.2 Kombinationsimplantate



**Abbildung 19: HUVEC-Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit rhVEGF<sub>165</sub>/ rhBMP-2-Releasemedium (Gruppe 3- VEGF).**

**Gabe des Mediums von ausgewählten Zeitpunkten des Releaseversuchs der Implantate Gruppe 3- VEGF – ausgegeben in Prozent zur Kontrolle der jeweiligen Zeitpunkte.**

In der rhVEGF<sub>165</sub>/ rhBMP-2 Kombinationsgruppe (Gruppe 3- VEGF) ergab sich zum Zeitpunkt 360 Std nahezu eine Verdopplung der Zellzahl auf 191,14% (Abbildung 19). Statistisch ließ sich jedoch zwischen den Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz feststellen ( $p = 0.3185$ ). Durchschnittlich ergaben sich die höchsten Proliferationszahlen zum Zeitpunkt 360 Std, der innerhalb dieses Versuchs den proliferationsstärksten Zeitpunkt darstellt (177,1%). Im Vergleich zum Zellwachstum des rhVEGF<sub>165</sub> Versuchs (Abbildung 18) ist dieser um 6 Tage später. Insgesamt ist die HUVEC- Zellpopulation um 51,88% in der 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Gruppe mit jeweils 400 µg/g bzw. 800 µg/g rhBMP-2 gewachsen, aber in der Gruppe mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> und den entsprechenden Mengen an rhBMP-2 nur um durchschnittlich 37,43% gewachsen. Für die 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Gruppe in Kombination mit rhBMP-2 ergibt sich im Vergleich zur 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> allein beladenen Implantaten, dass das rhBMP-2 das Wachstum der HUVEC-Zellen insgesamt um 7,42% positiv beeinflusst hat, im Gegensatz dazu in der 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Gruppe das rhBMP-2 einen negativen Effekt um 1,46% auf die HUVEC-Zellpopulation ausübte.

## 4 Diskussion

In der aktuellen Literatur findet man eine Vielfalt an unterschiedlichen Studien zum Thema Wachstumsfaktoren und ihren Trägermaterialien. Je mehr der Fokus jedoch auf die knöchernen Regeneration der kranio-maxillofazialen Chirurgie gelegt wird, desto mehr reduziert sich die Literaturlänge drastisch auf einen geringen Bruchteil. Momentane Ansätze erfordern das Beladen sehr großer Mengen teurer rekombinant hergestellter Wachstumsfaktoren, deren Freisetzung in Menge sowie Muster die natürliche Knochenheilung nur sehr begrenzt begünstigen können. Es besteht folglich großer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet.

In der hier vorliegenden Arbeit ist das Verhalten eines neuen Trägermaterials aus Poly-DL-Laktid in Kombination mit Calciumcarbonat getestet worden. Dieses wurde mit unterschiedlichen rekombinanten Wachstumsfaktoren (rhBMP-2; rhVEGF<sub>165</sub>), jeweils im Einzelnen und in Kombination, in einem definierten Verfahrensprozess beladen.

Es sollte das Freisetzungsmuster der inkorporierten Wachstumsfaktoren untersucht werden. Außerdem sollte festgestellt werden, ob das Beladen mit einem osteogenen und einem angiogenen Wachstumsfaktor eine abweichende Freisetzungskinetik hervorruft.

Des Weiteren war von besonderem Interesse, ob die freigesetzten Wachstumsfaktoren biologisch aktiv sind. Der Verfahrensprozess des Beladens wurde auf das Einbringen von biologisch aktiven Substanzen abgestimmt. Auch das Sterilisationsverfahren ( $\gamma$ -Bestrahlung) sollte die Faktoren in ihrer biologischen Aktivität nicht einschränken. Dies wurde anhand von Zellkulturversuchen untersucht. Hierzu wurde nach festgelegten Zeitpunkten über einen definierten Zeitraum sowohl die Induktion einer osteogenen Differenzierung mesenchymaler Zellen als auch die proliferationsfördernde Wirkung für das Endothelzellwachstum In-vitro der aus den Implantaten freigesetzten Faktoren an etablierten Zelllinien untersucht.

### 4.1 Diskussion der Methode

#### 4.1.1 Trägermaterial

An Knochenersatzmaterial wird eine Reihe von Anforderungen gestellt, die die Suche nach einem idealen Knochenersatzmaterial erschweren. In der Literatur gilt dementsprechend nach wie vor das autologe Knochentransplantat als „Goldstandard“ in der rekonstruktiven Knochenchirurgie (FRIEDLAENDER 1987). Ziel der Forschung sollte es jedoch sein, neue Materialien zu entwickeln, die diesen Idealen weitestgehend entsprechen oder sie sogar übertreffen. Aufgrund mehrerer individueller Vorteile, wie der

- fehlenden Notwendigkeit eines zweiten Eingriffs,

- dem breiteren Anwendungsspektrum auch bei im Wachstum befindlichen Patienten,
- der Möglichkeit nicht nur einer Beschichtung, sondern der Inkorporierung von biologisch aktiven Substanzen, oder die
- Erweiterbarkeit im Sinne des *Tissue Engineering* (zusätzliche Besiedlung mit mesenchymalen Vorläuferzellen),

ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass resorbierbare Implantate für den Ersatz verloren gegangener Knochensubstanz klinisch erfolgreich eingesetzt werden können. Die geringe Formkonstanz bereits vorhandener resorbierbarer Materialien wie beispielsweise Kollagene, die für den Bereich des knöchernen Gewebeersatzes unabdingbar ist, lenkte die Forschung in Richtung der resorbierbaren Polymere, insbesondere Polylaktid. Dieses zeichnet sich durch reproduzierbare sowie kontrollierbare chemische und physikalische Eigenschaften aus. Weitere wichtige Voraussetzungen wie geeignete Porosität, Porenstruktur und Porengröße konnten verwirklicht werden (ASCHERL et al. 2006; KLEIN et al. 2010).

Die im Körper stattfindende Degradation resorbierbarer Poly-D,L-Laktid-Knochenersatzmaterialien erfolgt bis hin zu Produkten, welche im Citratzyklus verstoffwechselt werden können. Dieses konnte an den in der vorliegenden Studie verwendeten individuellen Probekörper nur bedingt überprüft werden. Das Lösen in Zellkulturmedium simuliert unter den In-vitro-Bedingungen keineswegs die Bedingungen während der natürlichen Degradation eines implantierten Ersatzmaterials. Die Dauer von 28 Tagen entspricht nicht der Dauer der vollständigen knöchernen Wundheilung, sodass an den in den Versuchen verwendeten Implantaten kaum sichtbare Zeichen der Degradation vorzufinden waren. Die zu diesem Zeitpunkt erforderliche Stabilität scheint demnach gewährleistet zu sein. Es sollten weitere tierexperimentelle Untersuchungen angeschlossen werden, um valide Aussagen zur Degradation und den mechanischen Eigenschaften des Materials während der Degradation In-vivo treffen zu können.

Das in dieser vorliegenden Studie weiterentwickelte Polylaktidmaterial besitzt zur Pufferung eventuell freiwerdender saurer Valenzen alkalische Bestandteile aus Calciumcarbonat im Verhältnis 1:4 (SCHLIEPHAKE et al. 2015). Die damit verbundene Anwendung von Lösungsmitteln kann durch das hier gewählte Herstellungsverfahren umgangen werden. So ergeben sich Vorteile für die Beladung mit Wachstumsfaktoren, da diese bei der Verwendung von Lösungsmittel zerstört werden könnten (CHANG et al. 2007; JEON et al. 2007). Die während eines parallel laufenden Langzeitversuchs (150 Tage) durchgeführten pH-Messungen waren nicht Bestandteil dieser Dissertation, zeigten jedoch konstante pH-Werte während der gesamten Versuchsdurchführung, sodass die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  dem Effekt einer möglichen sauren Degradation erfolgreich

entgegenzuwirken scheint (SCHLIEPHAKE et al. 2015). Der Nachweis sollte jedoch auch in einem In-vivo-Modell mit Ausbleiben einer immunologischen Antwort auf den Zerfallsprozess des PDLLA/Calciumcarbonat-Implantat erbracht werden.

Biologisch passive Knochenersatzmaterialien haben eine rein osteokonduktive Wirkung und dienen dem einwachsenden Knochen lediglich als Leitschiene. Dieses Konzept ist für kleine knöchernen Defekte ausreichend, jedoch bleibt bei größeren Knochendefekten eine knöchernen Durchbauung aus. Durch Inkorporation osteoinduktiver Cytokine in diese Art von Materialien, im Sinne eines zusätzlichen *Drug-Delivery*-Systems, kann das regenerative Potential des ortsständigen Knochens unterstützt werden (BURG et al. 2000). Hierbei ist die große Herausforderung, dass die Inkorporation biologisch aktiver Wachstumsfaktoren besondere Voraussetzungen an den Herstellungsprozess erfordert (REZWAN et al. 2006).

Der in dieser Studie angewendete Verfahrensprozess zur Beladung aktiver Moleküle ist in der Lage, die gleichmäßige Verteilung der Faktoren in dem Trägermaterial und gleichzeitig eine offene Porenstruktur sicherzustellen. Dieses wurde in Vorstudien untersucht (GRUBER et al. 2009; SCHLIEPHAKE et al. 2008; SCHLIEPHAKE et al. 2007). Verschiedene Forschungsgruppen fanden heraus, dass andere Formen der Beladung beispielsweise durch Eintauchen der Implantate in entsprechende Lösungen zu einer Freisetzung des beladenen Faktors innerhalb kürzester Zeit (*Burst Release*) führten (ULUDAG et al. 2000; YANOSO-SCHOLL et al. 2010). Auch eine Bolusinjektion in leere Trägermaterialien ist aufgrund der geringen Halbwertszeit der Faktoren nicht erfolgreich (RICHARDSON et al. 2001; SMITH et al. 2004). So wird die Herausforderung aus einerseits Inkorporation aktiver Faktoren in das Material und andererseits der möglichst anhaltenden Freisetzung der Faktoren bei der Anwendung des Trägermaterials deutlich (HILE et al. 2000). Die in dieser Studie angewandte Methode der Herstellung des Polylaktid- Trägermaterials ermöglicht zusätzlich eine individuelle Formgebung des Trägermaterials. Die PTFE-Formen können komplexe dreidimensionale Strukturen nachahmen und erweitern das Anwendungsspektrum in der rekonstruktiven Chirurgie (WEIHE et al. 2001).

Zusammenfassend betrachtet erfüllt Poly-D-L-Laktid als Knochenersatzmaterial weitestgehend alle an ein Trägermaterial gestellten Anforderungen in Bezug auf Biofunktionalität und Biokompatibilität und erfüllt folglich die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Inkorporation von biologisch aktiven Substanzen.

#### **4.1.2 Wachstumsfaktoren**

Das in der Arbeit verwendete rhBMP-2 gilt als osteogener Wachstumsfaktor und soll die Regenerationsfähigkeit knöcherner Defekte fördern. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die für die In-vivo-Knochenheilung notwendigen mesenchymalen Vorläuferzellen

chemotaktisch angelockt werden und durch den Einfluss von *Bone Morphogenetic Proteins* zu reifen Osteoblasten differenzieren (LIND 1996). Kein anderer Wachstumsfaktor besitzt vergleichbare morphogenetische Eigenschaften (KUEBLER 1997). BMP wird seit Jahren in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie erforscht, wobei derzeit jedoch nur zwei Subtypen für die Anwendung am Menschen von der FDA zugelassen sind: BMP-2 und BMP-7 (OP-1) (BESSA et al. 2008; GAUTSCHI et al. 2007). In der vorliegenden Studie kommt rekombinantes humanes BMP-2, das aus dem Bakterium *E. coli* gewonnen wird, zur Anwendung. Durch die hohe Proteinausbeute und die gut etablierte Herstellungsart ergeben sich Vorteile gegenüber der Herstellung durch *Chinese hamster ovary cells* (CHO-Zellen) (HOFFMANN et al. 2001; VALLEJO et al. 2002). Reinigungsprozesse sorgen für ein hohes Maß an biologischer Potenz der rekombinant hergestellten BMP-2-Moleküle (WENDLER et al. 2005).

Die im Knochen vorkommende Menge an BMPs wird annähernd mit 1 µg/g beziffert (BLUM et al. 2004; KUEBLER 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Applikation des BMPs in relativ geringen Konzentrationen (200 µg/g - 1600 µg/g) getestet. Allerdings sind unerwünschte Nebenwirkungen wie toxische Reaktionen oder eine Immunisierung selbst bei hohen Mengen kaum nachweisbar (HARWOOD und GIANNOUDIS 2005). Die klinische Überwachung dieser Aussagen wird aufgrund der noch neuen Anwendungen als unerlässlich angesehen.

Als Nachweismethode des aus den Implantaten freigesetzten rhBMP-2 diene der Sandwich-ELISA-Test. Dieser Test wurde eigens für rekombinantes humanes BMP-2 entwickelt und stellte sicher, dass nur funktionell intaktes BMP-2 detektiert wird, da die Antikörper spezifisch nur für BMP-2-Dimere entwickelt wurden (ELISA-Entwicklung GmbH & Co. KG).

Als weiteren Nachweis schloss sich der Zellkulturversuch mit C2C12-Zellen an, um die biologische Aktivität festzustellen. Die C2C12-Zelllinie stammt aus sich regenerierendem Muskelgewebe von Mäusen. Sie unterliegt einer hohen Empfindlichkeit gegenüber der Handhabung unter Versuchsbedingungen. Untersuchungen haben belegt, dass C2C12-Zellen unter Einfluss von *Bone Morphogenetic Protein* über eine Aktivierung des ALK-1-Rezeptors in Osteoblasten differenzieren (HAN et al. 2003). Diese Art der Transdifferenzierung scheint einzigartig zu sein. BMP stimuliert die Proliferation sowie die Differenzierung der Mausmyoblasten etwa bis zum 6. Tag. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen differenziert und die Proliferationsrate nimmt ab (KATAGIRI et al. 1994). So scheint der Versuchsaufbau über etwa 3 Tage sehr sinnvoll (PEEL et al. 2003). Da die Differenzierung durch Zell-Zell-Kontakte beschleunigt beziehungsweise ausgelöst wird, ergibt sich die Notwendigkeit, die Zellen während der Versuche möglichst subkonfluent wachsen zu lassen, um den genauen Einfluss der BMP-Moleküle ermitteln zu können.



Zudem kann eine zu hohe Zelldichte in den mit BMP-2 behandelten Kulturen eine Kontaktinhibition verursachen. Alle Ausgangszellen der vorliegenden Versuche lagen grundsätzlich in subkonfluenten Bereichen. Eine konzentrationsbedingte Hemmung der Proliferation konnte folglich in den vorgestellten Untersuchungen durch lichtmikroskopische Überwachung ausgeschlossen werden.

Die Zellen produzieren während der Reifung in Osteoblasten alkalische Phosphatase, die wiederum als Nachweis einer Stimulierung durch biologisch aktives BMP dienen kann (WENDLER et al. 2005). Die alkalische Phosphatase ist in der Lage, den Phosphatrest vom sonst farblosen Chromogen p-Nitrophenylphosphat abzuspalten. Das entstandene p-Nitrophenol ist schwach gelb. Die Intensität der Farbe steigt mit der Konzentration des Nitrophenols, sodass mittels der Standardreihe Rückschlüsse auf die Konzentration der in der Probe vorhandenen AP geschlossen werden kann. Diese Art des Tests wird für In-vitro-Untersuchungen genutzt. Die Inkubationszeit von 3 - 4 Tagen wurde in unseren Versuchen eingehalten (FUJII et al. 1999).

Da die Knochenregeneration von mehreren Faktoren abhängig ist, besteht Forschungsinteresse an der kombinierten Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren. Rekombinantes BMP-2 wurde wie bereits oben beschrieben aufgrund der herausragenden osteoinduktiven Eigenschaften gewählt. Als kritischer Kofaktor der Heilung größerer Knochendefekte wird die Angiogenese und damit die Perfusion des Defekts angesehen. Die Blutversorgung stellt Sauerstoff und die für die Osteogenese notwendigen undifferenzierten mesenchymalen Zellen zur Verfügung. Der *Vascular Endothelial Growth Factor- A* ist einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren (FERRARA und GERBER 2001). Studien belegen bereits die erfolgreiche kontrollierte Freisetzung von VEGF im Rahmen der Angiogenese (KAIGLER et al. 2006; WERNIKE et al. 2010). Das in der vorliegenden Studie eingesetzte rhVEGF-A<sub>165</sub> ist aus dem *E. coli*- Bakterium gewonnen worden. Die Detektion des aus den individuellen Implantaten freigesetzten rhVEGF-A wurde mittels Sandwich- ELISA durchgeführt.

Die biologische Aktivität der freigesetzten rhVEGF<sub>165</sub>-Cytokine wurde mittels eines Zellkultur- Tests mit HUVEC-Zellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) untersucht. Basierend auf den Erkenntnissen, dass VEGF hauptsächlich auf Endothelzellen wirkt, stellt dieser Versuchsaufbau ein adäquates Instrument der Überprüfung der biologischen Aktivität beider Wachstumsfaktoren dar und wurde bereits in Studien anderer Forschungsgruppen angewandt (ITO et al. 2005; Q LI et al. 2011). VEGF-A stimuliert, sofern dieser durch den Herstellungsprozess der Implantate nicht denaturiert wurde, die Proliferation der HUVEC-Zellen (WANG et al. 1997). So dient die Zellzahl als indirekter Marker. Folglich konnten die Ergebnisse der rein mit rhVEGF-A beladenen Implantate

(Gruppe 2) mit denen, die mit zwei Wachstumsfaktoren in Kombination beladen worden waren, verglichen werden (Gruppe 3- VEGF).

Studien zeigten zwar, dass VEGF alleine die Knochenregeneration nicht verbessert (RICHARDSON et al. 2001; WERNIKE et al. 2010). Jedoch steigert es in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren, beispielsweise BMP-4, synergistisch die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und führt zu signifikant besserer Verknöcherung (HUANG et al. 2005; PENG et al. 2002; SAMEE et al. 2008).

Des Weiteren zeigte sich, dass die Relation zwischen der BMP-Menge und der VEGF-Menge entscheidende Auswirkungen hatte. Hohe Mengen BMP-2 in Kombination mit relativ geringen Mengen VEGF scheinen die besten Effekte auf die knöcherne Regeneration aufzuweisen (PENG et al. 2005). Die Kombination von VEGF und rhBMP-2 wurde an PLGA-Mikrosphären bereits ebenfalls mit Erfolg getestet (MATTAR et al. 2013). Auch Gelatine als Träger zeigte eine Verbesserung der knöchernen Durchbauung durch die Kombination von VEGF und BMP im Vergleich zu BMP allein (PATEL et al. 2008). Aufgrund der fehlenden Stabilität dieser Ersatzmaterialien können diese jedoch nur bei mehrwandigen knöchernen Defekten im klinischen Alltag eine Rolle spielen.

Eine Kombination beider Faktoren scheint aufgrund der starken gegenseitigen Beeinflussung sogar eine überadditive Wirkung zu besitzen (BOULETREAU et al. 2002; DECKERS et al. 2002; PENG et al. 2005). Das Auftreten der Wachstumsfaktoren während der Wundheilung folgt einem zeitlichen Muster (GERSTENFELD et al. 2007; KIDD et al. 2010; KURODA et al. 2005). VEGFs werden zu Beginn der Wundheilung ausgeschüttet, während BMPs im gesamten Verlauf eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (GERSTENFELD et al. 2003). Diese Reihenfolge sollte möglichst auch bei der Freisetzung aus den Polylaktidimplantaten eingehalten werden.

Wachstumsfaktoren sind sehr gut löslich und brauchen aus diesem Grund ein Trägermaterial, damit deren Halbwertszeit im Empfängergewebe verlängert wird (HINSENKAMP und COLLARD 2015). Ebenfalls verhindert man durch lokale Applikation der biologisch aktiven Substanz unnötig hohe systemische Konzentrationen und damit unerwünschte Nebenwirkungen. Etliche klinische Studien zeigten bereits positive Effekte der Cytokine, jedoch ist das ideale Trägermaterial noch nicht gefunden (HOFFMANN et al. 2001). Aufgrund dessen widmet sich diese vorliegende Arbeit der Optimierung eines Trägermaterials.

## 4.2 Bewertung der Ergebnisse

Die Releaseversuche der vorliegenden Arbeit zeigten eine verzögerte dosisabhängige Freisetzung in Bezug auf die Beladung mit rhBMP-2. Der Freisetzungsspeak ist bei den mit BMP alleine beladenen Implantaten bereits an Tag 3 (Abbildung 8) in der Kombination (Gruppe 3- BMP) bezogen auf die freigesetzte rhBMP-2-Menge an Tag 6 (Abbildung 10),

wobei sich hier jedoch zusätzlich nach einer Stunde eine deutlich erhöhte Freisetzung darstellte. Die Kombination mit einem weiteren Faktor führt folglich zu einer Verzögerung der freigesetzten Menge an BMP, jedoch ist dies nicht abhängig von der Konzentration des rhVEGF, da sich in der Freisetzungskinetik innerhalb der Konzentrationsgruppen keine signifikanten Änderungen ergaben (Abbildung 10). Insgesamt führte die Zugabe von VEGF ebenfalls etwa zu einer Vervierfachung der mit 400 µg/g rhBMP-2 beladenen Implantate bzw. Verdopplung der insgesamt freigesetzten BMP- Menge der entsprechenden 800 µg/g rhBMP-2 Gruppen (Tabelle 3 und Tabelle 4).

Eine Freisetzung von mindestens 100 ng/ml über einen Zeitraum von 28 Tagen scheint für die knöcherne Heilung notwendig zu sein (GRUBER et al. 2009). Dieses konnte lediglich bei den Implantaten die mit 200 µg/g und 400 µg/g rhBMP-2 beladen wurden nicht erreicht werden (Tabelle 3), wohingegen durch Zugabe von rhVEGF<sub>165</sub> dieses Ziel für alle Konzentrationsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf verwirklicht werden konnte (Tabelle 4). In der Literatur variiert die Angabe dieses Werts jedoch je nach Forschungsgruppe erheblich auf bis zu 50 µg (LIANG et al. 2005; SAITO et al. 2001).

Insgesamt lag die Menge des freigesetzten rhBMP-2 bei der Beladung mit rhBMP-2 alleine (Gruppe 1) zwischen 3% und 9% in einer Sättigungskurve förmigen Art (Abbildung 9). Im Gegensatz dazu steigerte sich bei der Kombination die Freisetzungsmenge stetig auf etwa 12% bis 14% des inkorporierten rhBMP-2 (Abbildung 11). Dies ist im Vergleich zu anderen Studien nach einer Beobachtungszeit von 27 Tagen relativ gering. Mit Kollagen beschichtete PLGA-Implantate erreichten Werte von mehr als 95% innerhalb der ersten 12 Stunden (YANOSO-SCHOLL et al. 2010). Andere Forschungsgruppen erreichten ca. 30% Freisetzung aus Kollagen-beschichtetem PLGA während des Versuchsverlaufs (HW LIU et al. 2006). Nach der Beobachtungszeit von 648 Stunden ist die Wundheilung in Bezug auf die knöcherne Regeneration nicht abgeschlossen. Folglich könnten zu diesem Zeitpunkt verbliebene Cytokine einen fortreichenden Einfluss auf die anschließenden Modelling Prozesse ausüben. Dieser sollte in weiteren Studien erforscht werden. Eine ähnliche Gesamtfreisetzung von unter 10%, wie sie in dieser Studie erzielt wurde, zeigten vorhergehende Studien mit geschäumten PDLLA ohne Zusatz von Calciumcarbonat, sodass das CaCO<sub>3</sub> in den Implantaten dieser Studie keinen Einfluss auf die Freisetzungskinetik zu besitzen scheint (SCHLIEPHAKE et al. 2007).

Der Gesamtverlauf der Gruppe 2 unterschied sich, betrachtet man den gesamten Versuchsablauf, in jeder Konzentration signifikant voneinander und auch von der Kontrollgruppe. Betrachtet man jedoch die Freisetzung der mit 400 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> beladenen Implantate, erkennt man das Muster eines *Burst Release*, was als Misserfolg gewertet werden kann (Abbildung 12). Andere Forschungsgruppen erkannten ein ähnliches Phänomen bei der Beladung von Keramik mit rhVEGF (WERNIKE et al. 2010),

oder der Beladung von beispielsweise Gelatinekügelchen mit rhVEGF (YOUNG et al. 2009). Bei den anderen Konzentrationen (Abbildung 12) und auch bei Gruppe 3- VEGF (Abbildung 14) ist dieses Phänomen nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Die Freisetzung scheint folglich von der Menge des beladenen Faktors abzuhängen. So sind die Verläufe ähnlich, jedoch in der Gruppe der Kombination auf einem wesentlich höheren Freisetzungsniveau. Welchen Einfluss das rhBMP-2 hierbei spielt, sollte in zusätzlichen Studien untersucht werden. Im Durchschnitt lag die Menge der mit 4 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> beladenen Implantate nur minimal oberhalb der noch zu detektierenden Menge (Abbildung 12) und scheint somit für den klinischen Alltag keine Relevanz zu besitzen. Interessanterweise änderte der Zusatz von rhBMP-2 das Freisetzungsmuster nicht deutlich, jedoch veränderte der Zusatz von rhBMP-2 die bis zum Ende der Beobachtungszeit insgesamt freigesetzte Menge des inkorporierten rhVEGF<sub>165</sub> im Gegensatz dazu deutlich. Während die mit 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> alleine beladenen Implantate prozentual mit zirka 40% am meisten rhVEGF<sub>165</sub> freisetzten und die mit 25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> am wenigsten freisetzten (ca. 5%) (Abbildung 13), kehrte sich dieses Verhältnis durch Zugabe von rhBMP-2 (Gruppe 3- VEGF) nahezu um (Abbildung 15). Dieser Effekt muss allerdings nach den vorliegenden Ergebnissen nicht konsistent sein und sollte in weiteren Untersuchungen nochmals überprüft werden.

Mögliche Einflüsse von Bestandteilen der eingesetzten Medien, die für die spätere Untersuchung der biologischen Aktivität unabdingbar waren, können in Bezug auf die Elisa-Tests nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Aus den Implantaten wurden in Bezug auf das inkorporierte rhBMP-2 aktive Cytokine über den gesamten Versuchszeitraum freigesetzt. Es zeigte sich ein bemerkenswerter Effekt der osteogenen Aktivität bei kombinierter Freisetzung (Abbildung 17) verglichen mit der Freisetzung von rhBMP-2 alleine (Abbildung 16). Zu erklären ist dieses Ergebnis durch den positiven Effekt von VEGF auf die C2C12-Zellen (SASSOLI et al. 2012). Leider war es aufgrund der Stichprobenanzahl nicht möglich, eine statistische Auswertung des Versuchs durchzuführen. Aufgrund dessen sollte der Versuchsaufbau für die kommenden Untersuchungen in einer abgewandelten Form wiederholt werden.

Die Bewertung der biologischen Aktivität der aus den individuellen Probenkörpern freigesetzten rhVEGF-Moleküle zeigte einen offensichtlichen Misserfolg verglichen zu den Leerkontrollen. Die Kombination der beiden Faktoren (Abbildung 19) führt im Gegensatz dazu in Bezug auf die Proliferationszahlen zu einer deutlichen Verbesserung. Diese Wechselwirkungen der beiden Faktoren sind im Rahmen der komplexen Wundheilung zu erwarten. Bekannt ist, dass HUVEC-Zellen ebenfalls durch BMP stimuliert werden können (ZHOU et al. 2007). BMP fördert Proliferation und Migration von Endothelzellen durch

Ausschüttung von VEGF und die Expression und Phosphorylierung von VEGFR2 (SUZUKI et al. 2008).

Außerdem scheint die Relation von VEGF zu BMP eine entscheidende Rolle zu spielen. Andere Gruppen fanden heraus, dass eine Relation von BMP zu VEGF von 5:1 bessere Ergebnisse brachte als umgekehrt (PENG et al. 2005). Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen konnte sich dieser Effekt auch bei der Proliferation der HUVEC-Zellen bestätigen. Die niedrigen Konzentrationen (25 µg/g rhVEGF<sub>165</sub>) mit den entsprechenden Mengen an BMP führte zu einer Verbesserung um 7,4%, während das BMP bei den 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> Implantaten zu einer Verschlechterung der Ergebnisse um etwa 1% führte, verglichen mit den 100 µg/g rhVEGF<sub>165</sub> alleine beladenen Implantaten (Abbildung 18 und Abbildung 19).

In den Untersuchungen zeigte sich für die individuellen Träger, welche mit jeweils zwei Faktoren beladen waren, für das jeweilige Untersuchungsmedium eine Verbesserung der Ergebnisse. Die Beladung mit zwei unterschiedlichen Faktoren war möglich.

### 4.3 Ausblick

Der Bedarf im Hinblick auf Weiterentwicklung und Verbesserung vorhandener Knochenersatzmaterialien wird dadurch deutlich, dass der autologe Knochen nach wie vor die erste Wahl darstellt, wenn verlorengegangene Substanz ersetzt werden soll. Eine Steigerung der ossären Regeneration durch Modifikationen von Knochenersatzmaterialien im Sinne einer Biofunktionalisierung ist ein Ansatz, durch den sich die Materialien zu einer vollwertigen Alternative zu autologem oder auch allogenem Knochen entwickeln könnten. Während der Wiederherstellung knöcherner Strukturen im menschlichen Organismus stellen die Vielzahl von komplexen intra- und extrazellulären Signalwegen und Stimuli die Forschung immer noch vor große Aufgaben. Diese Strukturen in ihrer Gänze nachvollziehen zu können, oder sogar gezielt in diese Prozesse einzugreifen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Folglich ist zum jetzigen Zeitpunkt der Einsatz dieser neuen Knochenersatzmaterialien klinisch noch sehr beschränkt, da die Fragen nach der physiologischen Anwendbarkeit nicht ausreichend geklärt sind. Hinzu kommt es zu Interaktionen mit dem Biomaterial In-vivo, deren Prozesse sich im Labor kaum abbilden lassen. Weiterhin stehen vereinheitlichte Testverfahren zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Materialien und deren biologischer Wertigkeit aus (CHAIKOF et al. 2002). Dennoch stellt die vorliegende In-vitro-Studie eine Grundlage für die Verbesserung der Materialkompositionen des Trägermaterials und die Optimierung der erforderlichen Menge an inkorporierten Cytokinen dar. Die Ergebnisse könnten dazu beitragen, zukünftig Alternativen für körpereigenes Material im klinischen Alltag zu entwickeln. Weiterhin erfordert die Interdisziplinarität des Themenbereiches Bioimplantate eine verstärkte Zusammenarbeit zwischen Medizin, Biotechnologie und pharmazeutischen Disziplinen.

## 5 Zusammenfassung

Der Ersatz knöcherner Strukturen gehört zum klinischen Alltag der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Die Wahl der Methode und des Ersatzmaterials ist von mehreren Faktoren abhängig: Hierzu gehören die aktuelle und langfristige mechanische Beanspruchbarkeit des Materials, die Verfügbarkeit, der technische Aufwand, die Kosten, die Morbidität des Patienten, die Komplikationsrate und die gesamte Behandlungsdauer (SCHIEKER und MUTSCHLER 2006). Aus diesem Grund ist die Suche nach dem idealen Knochenersatzmaterial von großer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung eines resorbierbaren Poly-D-L-Laktidmaterials, welches synthetischen Ursprungs ist. Die rein osteokonduktiven Eigenschaften sollen durch die Beladung mit osteoinduktiven Cytokinen erweitert werden. Hierfür wurde rekombinantes humanes BMP-2, rekombinantes humanes VEGF<sub>165</sub> sowie deren Kombination in unterschiedlichen Konzentrationen durch einen CO<sub>2</sub>-Begasungsprozess in die aufgeschäumten individuellen Polymerkörper eingebracht.

In einem ersten Versuch sollte die Freisetzungskinetik der inkorporierten Faktoren alleine sowie deren Kombination untersucht werden. Mittels ELISA-Tests wurde dies über einen Zeitraum von 648 Stunden zu zwölf verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Hierbei sollten konzentrationsabhängige Unterschiede miteinander verglichen werden.

In einem zweiten Versuch sollte die biologische Aktivität der Faktoren getestet werden. Die biologische Aktivität des freigesetzten rhBMP-2 wurde durch die Induktion von alkalischer Phosphatase in C2C12-Zellen gemessen.

Die biologische Aktivität des freigesetzten rhVEGF<sub>165</sub> wurde durch Anregung der Proliferation von HUVEC-Zellen bestimmt.

Insgesamt stellt das in der vorliegenden Studie getestete Polylaktidmaterial aus PDLLA/Calciumcarbonat ein mit dem bisherigem Stand der Wissenschaft der während der Knochenheilung ausgeschütteten Cytokine kompatibles Freisetzungsmuster zur Verfügung, und zwar unabhängig davon, ob diese alleine oder in Kombination inkorporiert wurden. Die Kombination der Faktoren zeigte in Bezug auf die prozentuale Freisetzung innerhalb der Beobachtungszeit in beiden Gruppen deutlich veränderte Ergebnisse. Die biologische Aktivität des rhBMP-2 und des rhVEGF<sub>165</sub> war gewährleistet. Die Kombination beider Faktoren führte in den biologischen Tests zu einer Verbesserung der Ergebnisse.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adden N, Gamble LJ, Castner DG, Hoffmann A, Gross G, Menzel H (2006):** Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces. *Langmuir* 22, 8197-8204

**Albrektsson T, Johansson C (2001):** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2, 96-101

**Allendorph GP, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izipisua Belmonte JC, Choe S (2007):** BMP-3 and BMP-6 Structures Illuminate the Nature of Binding Specificity with Receptors. *Biochemistry* 46, 12238-12247

**Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL (2003):** Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24, 401-416

**Alvarez P, Hee CK, Solchaga L, Snel L, Kestler HK, Lynch SE, Hollinger JO (2012):** Growth factors and craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 23, 20-29

**Andersson SR, Hakkarainen M, Inkinen S, Sodergard A, Albertsson AC (2010):** Polylactide stereocomplexation leads to higher hydrolytic stability but more acidic hydrolysis product pattern. *Biomacromolecules* 11, 1067-1073

**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

**Ascherl R, Erhardt W, Kerschbaumer S, Schmeller ML, Gradinger R:** Tierexperimentelle Untersuchungen. In: Gradinger R, Gollwitzer H (Hrsg.): *Ossäre Integration*. Springer Verlag, Berlin 2006, 30-37

**Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM (1996):** Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17, 93-102

**Aubin JE (2001):** Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2, 81-94

**Ayna M, Acil Y, Gulses A (2015):** Fate of a Bovine-Derived Xenograft in Maxillary Sinus Floor Elevation After 14 Years: Histologic and Radiologic Analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 35, 541-547

**Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG (2000):** Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharm Res* 17, 497-504

**Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W (1994):** Cellular and molecular biological events at the implant interface. *J Craniomaxillofac Surg* 22, 12-17

**Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P (2011):** Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 21, 407-429

**Bartl R, Bartl C:** Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2011

- Batge B, Diebold J, Stein H, Bodo M, Muller PK (1992):** Compositional analysis of the collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue. *Eur J Clin Invest* 22, 805-812
- Bender R, Lange S (2007):** Was ist der p- Wert? *Dtsch Med Wochenschr* 132 Suppl 1, e15-16
- Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008):** Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2, 81-96
- Bhakta G, Lim ZX, Rai B, Lin T, Hui JH, Prestwich GD, van Wijnen AJ, Nurcombe V, Cool SM (2013):** The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. *Acta Biomater* 9, 9098-9106
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997):** Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH (2002):** Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 364, 329-341
- Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C (1985):** Plasticity of the differentiated state. *Science* 230, 758-766
- Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoph K, Haggard W (2004):** Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 27 Suppl 1, 161-165
- Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE (2000):** The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine (Phila Pa 1976)* 25, 376-381
- Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, Garcia AJ, Goldberg RE (2011):** Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials* 32, 5241-5251
- Bolander ME (1992):** Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200, 165-170
- Böstman O, Hirvensalo E, Makinen J, Rokkanen P (1990):** Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *Bone & Joint Journal* 72-B, 592-596
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002):** Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109, 2384-2397
- Braun W, Rüter A (1996):** [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. *Unfallchirurg* 99, 59-67
- Breen EC (2007):** VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 102, 1358-1367
- Brighton CT, Hunt RM (1991):** Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73, 832-847



- Brown KV, Li B, Guda T, Perrien DS, Guelcher SA, Wenke JC (2011):** Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. *Tissue Eng Part A* 17, 1735-1746
- Bruder SP, Fox BS (1999):** Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res* 367 Suppl, 68-83
- Burg KJ, Porter S, Kellam JF (2000):** Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21, 2347-2359
- Canalis E (1985):** Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 193, 246-263
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1991):** Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg Am* 73, 1418-1428
- Chaikof EL, Matthew H, Kohn J, Mikos AG, Prestwich GD, Yip CM (2002):** Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 961, 96-105
- 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 A* 81, 771-780
- Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J (2007):** Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 28, 1027-1035
- Chen RR, Mooney DJ (2003):** Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering. *Pharm Res* 20, 1103-1112
- Chen Y, Xu Z, Smith C, Sankar J (2014):** Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants. *Acta Biomater* 10, 4561-4573
- Chvapil M (1977):** Collagen sponge: Theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res* 11, 721-741
- Cunniffe G, Dickson G, Partap S, Stanton K, O'Brien F (2010):** Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 21, 2293-2298
- Dale L, Jones CM (1999):** BMP signalling in early *Xenopus* development. *Bioessays* 21, 751-760
- Damien E, Revell PA (2004):** Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications. *J Appl Biomater Biomech* 2, 65-73
- Danesh SM, Villasenor A, Chong D, Soukup C, Cleaver O (2009):** BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expr Patterns* 9, 255-265
- Davies JE (2003):** Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67, 932-949
- Dawson NS, Zawieja DC, Wu MH, Granger HJ (2006):** Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells. *FASEB J* 20, 991-993

- De Groot K (1988):** Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann N Y Acad Sci* 523, 227-233
- De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T (2007):** Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89, 649-658
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW (2002):** Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545-1553
- Deller T:** Gewebe. In: Welsch U, Kummer C (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage; Urban & Fischer in Elsevier, München 2014, 81-232
- Dewair M, Baur X, Ziegler K (1985):** Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins. *J Allergy Clin Immunol* 76, 537-542
- Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV (2005):** Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26, 5983-5990
- Dittrich VW, Schulz RC (1971):** Kinetik und Mechanismus der ringöffnenden Polymerisation von L(—)-Lactid. *Angew Makromol Chem* 15, 109-126
- Drenckhahn D:** Allgemeine Gewebelehre. In: Drenckhahn D (Hrsg.): *Anatomie Benninghoff/ Drenckhahn*. Band 1 Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Sklett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 17. Auflage; Elsevier, München 2008, 93-208
- el-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1995):** Bioactive material template for in vitro synthesis of bone. *J Biomed Mater Res* 29, 359-370
- Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, von Garrel T, Gotzen L, Wilke A (2005):** [Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts--an "in vitro" analysis of immunomodulation]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 143, 660-668
- Engstrand T, Veltheim R, Arnander C, Docherty-Skog AC, Westermarck A, Ohlsson C, Adolfsson L, Larm O (2008):** A novel biodegradable delivery system for bone morphogenetic protein-2. *Plast Reconstr Surg* 121, 1920-1928
- Epple M (2001):** Biomaterialien: von Fremdkörpern im Gewebe hin zu funktionellen Implantaten. *Biomed Tech* 46, 36-38
- Epple M:** Stoffklassen von Biomaterialien. In: Epple M: *Biomaterialien und Biomineralisation*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden 2003a, 35-69
- Epple M:** Zwei Fallbeispiele für Biomaterialien. In: Epple M: *Biomaterialien und Biomineralisation*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden 2003b, 78-102
- Eufinger H, Rasche C, Lehm Brock J, Wehmoller M, Weihe S, Schmitz I, Schiller C, Epple M (2007):** Performance of functionally graded implants of polylactides and calcium phosphate/calcium carbonate in an ovine model for computer assisted craniectomy and cranioplasty. *Biomaterials* 28, 475-485

- Felice P, Marchetti C, Iezzi G, Piattelli A, Worthington H, Pellegrino G, Esposito M (2009):** Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs. bovine anorganic bone. Clinical and histological results up to one year after loading from a randomized-controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 20, 1386-1393
- Ferguson D, Davis WL, Urist MR, Hurt WC, Allen EP (1987):** Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin Orthop Relat Res* 219, 251-258
- Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM (1992):** Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 17, 1474-1480
- Ferrara N (1996):** Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 32A, 2413-2422
- Ferrara N (2004):** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25, 581-611
- Ferrara N, Gerber HP (2001):** The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106, 148-156
- Ferrara N, Henzel WJ (1989):** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-858
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992):** Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13, 18-32
- Fiebich BL, Jager B, Schollmann C, Weindel K, Wilting J, Kochs G, Marme D, Hug H, Weich HA (1993):** Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J Biochem* 211, 19-26
- Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W (1995):** Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol* 171, 399-414
- Frattolin J, Barua R, Aydin H, Rajagopalan S, Gottellini L, Leask R, Yue S, Frost D, Bertrand OF, Mongrain R (2015):** Development of a Novel Biodegradable Metallic Stent Based on Microgalvanic Effect. *Ann Biomed Eng* 44, 404-418
- Friedenstein AJ:** Determined and inducible osteogenetic precursor cells. In: Elliott K, Fitzsimons DW (Hrsg.): *Ciba Foundation Symposium 11 - Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization*. John Wiley & Sons, Chichester (UK) 1973, 169-181
- Friedenstein AJ (1976):** Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47, 327-359
- Friedlaender GE (1987):** Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 69, 786-790
- Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW (1976):** Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 58, 854-858

- Friess W (1998):** Collagen--biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 45, 113-136
- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K (1999):** Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10, 3801-3813
- Garg AK:** Die Physiologie des Knochens in der zahnärztlichen Implantologie. In: Garg AK: Knochen - Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie. Quintessenz Verlag, Berlin 2006a, 1-20
- Garg AK:** Übersicht der Knochenaugmentationsmaterialien. In: Garg AK: Knochen - Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie. Quintessenz Verlag, Berlin 2006b, 21-55
- Garg AK:** Biologische Wachstumsfaktoren und Knochenmorphogene in der Knochenregeneration. In: Garg AK: Knochen - Biologie, Gewinnung, Transplantation in der zahnärztlichen Implantologie. Quintessenz Verlag, Berlin 2006c, 253-271
- Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R (2007):** Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77, 626-631
- Gerber HP, Ferrara N (2000):** Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10, 223-228
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999):** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998):** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-30343
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003):** Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88, 873-884
- Gerstenfeld LC, Edgar CM, Kakar S, Jacobsen KA, Einhorn TA:** Osteogenic Growth Factors and Cytokines and Their Role in Bone Repair. In: Bronner F, Farach-Carson MC, Mikos AG (Hrsg.): *Engineering of Functional Skeletal Tissues*. Springer Verlag, London 2007, 17-45
- Glasmacher B, Urban GA, Sternberg K, Kraft M, Moussavi D:** 7 Biomaterialien, Implantate, Tissue Engineering. In: Morgenstern U, Kraft M (Hrsg.): *Biomedizinische Technik - Faszination, Einführung, Überblick*. Band 1. Walter de Gruyter, Berlin 2014, 131-168
- Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr., 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
- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G (1987):** Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8, 95-114

- Gruber R, Weich HA, Dullin C, Schliephake H (2009):** Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactic acid and rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* 20, 24-30
- Gunatillake PA, Adhikari R (2003):** Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 5, 1-16
- Günther K, Scharf HP, Puhl W (1993):** In-vitro-Toxizitätstestung von Biokeramiken und Knochentransplantaten in der Fibroblastenkultur - In-vitro-Toxicity Testing of Ceramics and Bone Transplants in a Fibroblast Culture Model. *Biomed Tech* 38, 249
- Ha SW, Wintermantel E:** Biokompatible Keramische Werkstoffe. In: Wintermantel E, Ha SW: *Medizintechnik*. Springer Verlag, Berlin 2009, 277-297
- Ha SW, Wintermantel E, Maier G:** Biokompatible Polymere. In: Wintermantel E, Ha SW: *Medizintechnik*. Springer Verlag, Berlin 2009, 219-276
- Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo UM (2007):** Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol* 34, 444-451
- Han B, Tang B, Nimni ME (2003):** Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *Journal of Orthopaedic Research* 21, 648-654
- Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW (1990):** Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 29, 166-172
- Harwood PJ, Giannoudis PV (2005):** Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin Drug Saf* 4, 75-89
- Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K, Fischer JH, Wagner M, Kruger G, Wintermantel E, Gerlach KL (2001):** Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials* 22, 2371-2381
- Heinemann S, Gelinsky M, Worch H, Hanke T (2011):** Resorbierbare Knochenersatzmaterialien: Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze. *Orthopäde* 40, 761-773
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997):** TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471
- Hench LL (2006):** The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 17, 967-978
- Hench LL, Paschall HA (1974):** Histochemical responses at a biomaterial's interface. *J Biomed Mater Res* 8, 49-64
- Hench LL, Wilson J (1984):** Surface-active biomaterials. *Science* 226, 630-636
- Hile DD, Amirpour ML, Akgerman A, Pishko MV (2000):** Active growth factor delivery from poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO(2). *J Control Release* 66, 177-185
- Hinsenkamp M, Collard JF (2015):** Growth factors in orthopaedic surgery: demineralized bone matrix versus recombinant bone morphogenetic proteins. *Int Orthop* 39, 137-147

- Hirschi KK, Skalak TC, Peirce SM, Little CD (2002):** Vascular Assembly in Natural and Engineered Tissues. *Ann N Y Acad Sci* 961, 223-242
- Hoffmann A, Weich HA, Gross G, Hillmann G (2001):** Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 294-308
- Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D (1996):** Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 324, 55-65
- Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, Paik KJ, Duscher D, Gurtner GC, Lorenz HP et al. (2014):** The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3, 390-399
- Hoth M, Wischmeyer E:** Blut. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kortz A, Leipziger J, Müller F et al.: *Physiologie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012, 164-191
- Hsiong SX, Mooney DJ (2006):** Regeneration of vascularized bone. *Periodontol 2000* 41, 109-122
- Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005):** Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 20, 848-857
- Huh J-B, Yang J-J, Choi K-H, Bae JH, Lee J-Y, Kim S-E, Shin S-W (2015):** Effect of rhBMP-2 Immobilized Anorganic Bovine Bone Matrix on Bone Regeneration. *Int J Mol Sci* 16, 16034-16052
- Ito Y, Hasuda H, Terai H, Kitajima T (2005):** Culture of human umbilical vein endothelial cells on immobilized vascular endothelial growth factor. *J Biomed Mater Res A* 74, 659-665
- Jarcho M, Kay JF, Gumaer KI, Doremus RH, Drobeck HP (1977):** Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng* 1, 79-92
- Jell G, Stevens MM (2006):** Gene activation by bioactive glasses. *J Mater Sci Mater Med* 17, 997-1002
- Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ (2010):** Regulation of gene expression in osteoblasts. *BioFactors* 36, 25-32
- Jeon O, Song SJ, Kang S-W, Putnam AJ, Kim B-S (2007):** Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(l-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 28, 2763-2771
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC (1998):** Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13, 793-802
- Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M:** *Histologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005

- Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH (2006):** VEGF Scaffolds Enhance Angiogenesis and Bone Regeneration in Irradiated Osseous Defects. *J Bone Miner Res* 21, 735-744
- Kang W, Kim S, Lee S, Jeon E, Lee Y, Yun YR, Suh CK, Kim HW, Jang JH (2013):** Characterization and optimization of vascular endothelial growth factor(165) (rhVEGF(165)) expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 87, 55-60
- Karageorgiou V, Kaplan D (2005):** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491
- Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D (2004):** Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 71A, 528-537
- Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, Chen J, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2006):** Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* 78A, 324-334
- Kasperk C, Ewers R, Simons B, Kasperk R (1988):** Knochenersatzmaterial aus Algen. *Dtsch Zahnarztl Z* 43, 116-119
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T (1994):** Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127, 1755-1766
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998):** Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49-61
- Kidd LJ, Stephens AS, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Wu AC, Forwood MR (2010):** Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing. *Bone* 46, 369-378
- Kim NH, Lee SH, Ryu JJ, Choi KH, Huh JB (2015):** Effects of rhBMP-2 on Sandblasted and Acid Etched Titanium Implant Surfaces on Bone Regeneration and Osseointegration: Spilt-Mouth Designed Pilot Study. *Biomed Res Int* 2015, 459393
- Kim YH, Tabata Y (2015):** Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 94, 28-40
- Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, Hilbe M, von Rechenberg B, McCool J, Abrahamsen L et al. (2007):** BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone* 41, 247-255
- Klawitter JJ, Hulbert SF (1971):** Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res* 5, 161-229
- Klein MO, Götz H, Duschner H, Wagner W (2010):** Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien. Eine Übersicht. *MKG-Chirurg* 3, 274-281
- Kleine VJ, Kleine H-H (1959):** Über hochmolekulare, insbesondere optisch aktive Polyester der milchsäure, ein Beitrag zur Stereochemie makromolekularer Verbindungen. *Makromol Chem* 30, 23-38

- Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann HP (2005):** VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 63, 1310-1316
- Koch FW, Bastian P, Seidel M:** Heterotope Ossifikationen und Verkalkungen. In: Peters KM, König DP (Hrsg.): Fortbildung Osteologie 1. Steinkopff Verlag, Darmstadt 2006, 81-110
- Köster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R (1976):** Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphat-Keramik. *Langenbecks Arch Chiv* 341, 77-86
- Kroeze R, Helder M, Govaert L, Smit T (2009):** Biodegradable Polymers in Bone Tissue Engineering. *Materials* 2, 833
- Kronenthal RL:** Biodegradable Polymers in Medicine and Surgery. In: Kronenthal RL, Oser Z, Martin E: *Polymers in Medicine and Surgery*. Springer US, Boston (MA) 1975, 119-137
- Kuebler NR (1997):** Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1, 2-25
- Kuroda S, Viridi AS, Dai Y, Shott S, Sumner DR (2005):** Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif Tissue Int* 77, 212-225
- Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr. (1989):** Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine (Phila Pa 1976)* 14, 1324-1331
- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007):** Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 23, 844-854
- Li J, Zhang Y-P, Kirsner RS (2003):** Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 60, 107-114
- Li Q, Hou T, Zhao J, Xu J (2011):** Vascular endothelial growth factor release from alginate microspheres under simulated physiological compressive loading and the effect on human vascular endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 17, 1777-1785
- Liang G, Yang Y, Oh S, Ong JL, Zheng C, Ran J, Yin G, Zhou D (2005):** Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. *Biomaterials* 26, 4265-4271
- Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA (2002):** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A, 1032-1044
- Lind M (1996):** Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 67, 407-417
- Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M, Rueger JM, Epple M (2001):** Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Res* 54, 162-171
- Liu HW, Chen CH, Tsai CL, Hsiue GH (2006):** Targeted delivery system for juxtacrine signaling growth factor based on rhBMP-2-mediated carrier-protein conjugation. *Bone* 39, 825-836
- Liu X, Ma P (2004):** Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng* 32, 477-486



**Lüllmann-Rauch R:** Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012

**Mannaioni FP, Di Bello GM, Masini E (1997):** Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 46, 4-18

**Manolagas SC (2000):** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21, 115-137

**Martin C, Winet H, Bao JY (1996):** Acidity near eroding polylactide-polyglycolide in vitro and in vivo in rabbit tibial bone chambers. *Biomaterials* 17, 2373-2380

**Marx RE, Garg AK (1998):** Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 7, 267-276

**Mattar T, Friedrich PF, Bishop AT (2013):** Effect of rhBMP-2 and VEGF in a vascularized bone allotransplant experimental model based on surgical neoangiogenesis. *J Orthop Res* 31, 561-566

**Mayer J, Blum J, Wintermantel E:** Grundlagen des Tissue Engineering. In: Wintermantel E, Ha S-W: Medizintechnik. Springer Berlin, 2009, 373-386

**Meinel L, Kaplan DL (2012):** Silk constructs for delivery of muskuloskeletal therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 64, 1111-1122

**Min B-M, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH (2004):** Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25, 1289-1297

**Misch CM (2010):** Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent* 19, 361

**Miyazono K (2000):** Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. *J Cell Sci* 113, 1101-1109

**Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y (1997):** Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone* 20, 101-107

**Mohan S, Baylink DJ (1991):** Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 263, 30-48

**Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001):** Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71, 354-361

**Moser N BJ, Backhaus S, Annen T, Epple M, Schliephake H:** Einfluss der kombinierten Freisetzung von rhBMP2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Calciumkarbonat-Gerüsten auf die In-vitro-Aktivität der Angiogenese und Osteogenese. [Vortrag am 02.06.2012 auf dem 62. Kongress der deutschen Gesellschaft für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie in Freiburg (31. Mai bis 2. Juni 2012); Hauptthema 2: Augmentationen/Faktoren/Tissue Engineering/Stammzellen/Stammzellen und Faktoren

**Müller E (1924):** Untersuchungen über die durchbohrenden Knochenkanäle. *Arch mikros Ana Entwicklungsmechanik* 103, 308-338

- Mundy GR, Boyce B, Hughes D, Wright K, Bonewald L, Dallas S, Harris S, Ghosh-Choudhury N, Chen D, Dunstan C et al. (1995):** The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone* 17, 71S-75S
- Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F (2007):** How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12, E258-266
- Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA (1999):** Bone and bone substitutes. *Periodontol 2000* 19, 74-86
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA (1998):** Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 152, 1445-1452
- Noble BS (2008):** The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473, 106-111
- Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ (1999):** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 154, 375-384
- Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T (2002):** Expression of bone morphogenetic protein in the course of osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res* 13, 80-85
- Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006):** VEGF receptor signalling ? in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371
- Oreamuno S, Lekovic V, Kenney EB, Carranza FA, Jr., Takei HH, Prokic B (1990):** Comparative clinical study of porous hydroxyapatite and decalcified freeze-dried bone in human periodontal defects. *J Periodontol* 61, 399-404
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990):** Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143, 420-430
- Parfitt AM (1994):** Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55, 273-286
- Parfitt AM, Mundy GR, Roodman GD, Hughes DE, Boyce BF (1996):** A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 11, 150-159
- Park YJ, Kim KH, Lee JY, Ku Y, Lee SJ, Min BM, Chung CP (2006):** Immobilization of bone morphogenetic protein-2 on a nanofibrous chitosan membrane for enhanced guided bone regeneration. *Biotechnol Appl Biochem* 43, 17-24
- Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008):** Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* 43, 931-940
- Peel SA, Hu ZM, Clokie CM (2003):** In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: in vitro studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg* 14, 284-291

- Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J (2005):** VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 2017-2027
- Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen H-C, Cummins J, Huard J (2002):** Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110, 751-759
- Poynton AR, Lane JM (2002):** Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 27, 40-48
- Quelch KJ, Melick RA, Bingham PJ, Mercuri SM (1983):** Chemical composition of human bone. *Arch Oral Biol* 28, 665-674
- Reddi AH (1994):** Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4, 737-744
- Reddi AH (1997):** Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 11-20
- Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N (1987):** Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18, 207-212
- Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S (2012):** Knochenersatz. Transplantate und Ersatzmaterialien -- ein Update. *Unfallchirurg* 115, 938-949
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006):** Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413-3431
- Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ (2001):** Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotech* 19, 1029-1034
- Roberts AB (1998):** Molecular and Cell Biology of TGF- $\beta$ . *Miner Electrolyte Metab* 24, 111-119
- Roberts WE (1988):** Bone tissue interface. *Int J Oral Implantol* 5, 71-74
- Roodman GD (1996):** Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17, 308-332
- Rooney T, Berman S, Indresano AT (1988):** Evaluation of porous block hydroxylapatite for augmentation of alveolar ridges. *J Oral Maxillofac Surg* 46, 15-18
- Rubin AL, Miyata T, Stenzel KH (1969):** Collagen: Medical and Surgical Applications. *J Macromol Sci A - Chem* 3, 113-118
- Rueger JM (1998):** Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 27, 72-79
- Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (1999):** Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277, C628-637
- Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K, Takaoka K (2001):** A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol* 19, 332-335

- Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S (2008):** Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Transfection to Human Periosteal Cells Enhances Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *J Pharmacol Sci* 108, 18-31
- Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M (1999):** In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* 46, 382-389
- Sassoli C, Pini A, Chellini F, Mazzanti B, Nistri S, Nosi D, Saccardi R, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L (2012):** Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PLoS One* 7, e37512
- Sato Y (2001):** Current understanding of the biology of vascular endothelium. *Cell Struct Funct* 26, 9-10
- Schaaf H, Lendeckel S, Howaldt HP, Streckbein P (2010):** Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109, 52-58
- Schieker M, Mutschler W (2006):** [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 109, 715-732
- Schiller C, Epple M (2003):** Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. *Biomaterials* 24, 2037-2043
- Schiller C, Rasche C, Wehmoller M, Beckmann F, Eufinger H, Epple M, Weihe S (2004):** Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate. *Biomaterials* 25, 1239-1247
- Schliephake H (2002):** Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 469-484
- Schliephake H (2010):** Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14, 17-22
- Schliephake H, Botel C, Forster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D (2012):** Effect of oligonucleotide mediated immobilization of bone morphogenic proteins on titanium surfaces. *Biomaterials* 33, 1315-1322
- Schliephake H, Vucak M, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M (2015):** Solvent free production of porous PDLLA/calcium carbonate composite scaffolds improves the release of bone growth factors. *Oral Maxillofac Surg* 19, 133-141
- 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, Weich HA, Schulz J, Gruber R (2007):** In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *J Biomed Mater Res A* 83, 455-462
- Schmidmaier G, Wildemann B:** Biologische und physiologische Grundlagen. In: Gradinger R, Gollwitzer H, (Hrsg.): *Ossäre Integration*. Springer Verlag, Berlin 2006, 24-29

- Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009):** Tissue engineering of bone tissue. *Unfallchirurg* 112, 785-795
- Schmidt RE:** Immunsystem, Infektion und Abwehr. In: Fölsch UR, Kochsiek K, Schmidt RF: Pathophysiologie. Springer Verlag, Berlin 2000, 29-44
- Schmidt W:** Bewegungssystem - Grundlagen. In: Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W et al.: Anatomie. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2014, 221-246
- Schnuerer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ (2003):** Knochenersatzwerkstoffe. *Orthopäde* 32, 2-10
- Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E, Allen TD (1995):** Pericyte differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 313, 81-91
- Schultze- Mosgau S:** Hart- und Weichgewebsdefizite. In: Neukam FW, Wichmann M, Wiltfang J: Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007, 2-17
- Seeherman HJ, Bouxsein M, Kim H, Li R, Li XJ, Aiolova M, Wozney JM (2004):** Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. *J Bone Joint Surg Am* 86-A, 1961-1972
- Shah-Derler B, Wintermantel E, Ha S-W:** Blut. In: Wintermantel E, Ha S-W: Medizintechnik. Springer Medizin Verlag, Berlin 2009, 155-162
- Siebert HR, Wagner K, Rueger JM (1986):** Biologische Wertigkeit verschiedener Knochenersatzmittel in der Behandlung von Knochendefekten. *Unfallchirurgie* 12, 98-100
- Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG (2001):** Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581-2593
- Silver F, Christiansen D:** Wound Healing. In: Silver F, Christiansen D: Biomaterials Science and Biocompatibility. Springer New York, 1999, 241-277
- Sims NA, Gooi JH (2008):** Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 19, 444-451
- Sinikovic B, Kramer FJ, Swennen G, Lubbers HT, Dempf R (2007):** Reconstruction of orbital wall defects with calcium phosphate cement: clinical and histological findings in a sheep model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36, 54-61
- Smith MK, Peters MC, Richardson TP, Garbern JC, Mooney DJ (2004):** Locally enhanced angiogenesis promotes transplanted cell survival. *Tissue Eng* 10, 63-71
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL (2001):** Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54, 139-148
- Stains JP, Civitelli R (2005):** Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 72-80

- Steffens GC, Yao C, Prevel P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, Pallua N (2004):** Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng* 10, 1502-1509
- Steinemann SG (1998):** Titanium--the material of choice? *Periodontol* 2000 17, 7-21
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A et al. (2002):** Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9656-9661
- Stuetzle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L (1998):** Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien. *Orthopäde* 27, 118-125
- Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D (2014):** Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Circ* 4, 535-551
- Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, Ueda M (2006):** Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3238-3248
- Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, Watabe T, Miyazono K (2008):** BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem* 143, 199-206
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ (2005):** Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 87, 1367-1378
- Teschner M, Küsswetter W (1999):** Gentechnisch induziertes Knochenwachstum. *Dtsch Arztebl International* 96, 1891-1896
- Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piattelli A (2007):** A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *J Periodontol* 78, 955-961
- Triffitt JT (1987):** The special proteins of bone tissue. *Clin Sci (Lond)* 72, 399-408
- Tschakaloff A, Schliephake H, Dard M (2000):** Pilotstudie zur kontrollierten Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Polylaktidkörpern. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 2, 474-478
- Tzaphlidou M, Zaichick V (2003):** Calcium, Phosphorus, calcium-phosphorus ratio in rib bone of healthy humans. *Biol Trace Elem Res* 93, 63-74
- Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T (2003):** Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 32, 491-501
- Uebersax L, Apfel T, Nuss KM, Vogt R, Kim HY, Meinel L, Kaplan DL, Auer JA, Merkle HP, von Rechenberg B (2013):** Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 85, 107-118

- 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
- Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J (1999):** Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46, 193-202
- Urist MR, Strates BS (1971):** Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50, 1392-1406
- Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U (2002):** Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 94, 185-194
- Venkatesan J, Kim S-K (2010):** Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview. *Marine Drugs* 8, 2252-2266
- Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P (1992):** Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci Mater Med* 3, 432-446
- Wahl DA, Czernuszka JT (2006):** Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* 11, 43-56
- Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K (1997):** Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138, 2953-2962
- Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Götz H, Duschner H, Wagner W (2000):** Bestimmung der Größe der spezifischen Oberfläche von Knochenersatzmaterialien mittels Gasadsorption. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 4, 148-152
- Weihe S, Epple M (2001):** Vom Fremdkörper zum biologisch aktiven Implantat. *Rubin* 2/01, 18-21
- Weihe S, Wehmöller M, Schiller C, Rasche C, Eufinger H, Epple M (2001):** Formgebung degradierbarer Werkstoffe mit Hilfe der Verfahrenskette zur Fertigung individueller CAD/CAM- Implantate. *Biomed Tech* 46, 214
- Wendler J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Bilitewski U (2005):** Development of an enzyme-linked immunoreceptor assay (ELIRA) for quantification of the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biotechnol* 119, 425-435
- Wenk E, Wandrey AJ, Merkle HP, Meinel L (2008):** Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J Control Release* 132, 26-34
- Wenz B, Oesch B, Horst M (2001):** Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 22, 1599-1606
- Wernike E, Montjovent MO, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W, Klenke FM (2010):** VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater* 19, 30-40

- Williams DF (1977a):** Titanium as a metal for implantation. Part 1: physical properties. *J Med Eng Technol* 1, 195-198
- Williams DF (1977b):** Titanium as a metal for implantation. Part 2: biological properties and clinical applications. *J Med Eng Technol* 1, 266-270
- Williams DF (2008):** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29, 2941-2953
- Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P (2002):** Degradation characteristics of  $\alpha$  and  $\beta$  tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* 63, 115-121
- Witte F (2015):** Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review. *Acta Biomater* 23 Suppl, 28-40
- Wozney JM (1989):** Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1, 267-280
- 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
- Yanoso-Scholl L, Jacobson JA, Bradica G, Lerner AL, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Zuscik MJ, Awad HA (2010):** Evaluation of dense polylactic acid/beta-tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 95, 717-726
- Yao C, Roderfeld M, Rath T, Roeb E, Bernhagen J, Steffens G (2006):** The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices. *Biomaterials* 27, 1608-1616
- Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M et al. (2009):** Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Eng Part A* 15, 2347-2362
- Younger EM, Chapman MW (1989):** Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3, 192-195
- Zellin G, Linde A (1997):** Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 35, 181-190
- Zhou Q, Heinke J, Vargas A, Winnik S, Krauss T, Bode C, Patterson C, Moser M (2007):** ERK signaling is a central regulator for BMP-4 dependent capillary sprouting. *Cardiovasc Res* 76, 390-399



## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der osteogenen Differenzierung. ....	4
Abbildung 2: Fotografie der Formen. ....	35
Abbildung 3: Fotografie des Implantatkörpers. ....	36
Abbildung 4: Mikro- Computertomographie des Implantatkörpers. ....	37
Abbildung 5: rhBMP-2-Releaseversuchsaufbau. ....	39
Abbildung 6: rhVEGF <sub>165</sub> -Releaseversuchsaufbau. ....	39
Abbildung 7: Schematische Darstellung des BMP- Elisa- Prinzips. ....	40
Abbildung 8: rhBMP-2-Gesamtrelease der mit rhBMP-2 beladenen Implantate (Gruppe 1). .....	49
Abbildung 9: Kumulierter <i>Release</i> in Prozent (Gruppe 1). ....	50
Abbildung 10: rhBMP-2-Gesamtrelease der mit rhBMP-2 und rhVEGF <sub>165</sub> beladenen Implantate (Gruppe 3- BMP). ....	51
Abbildung 11: Kumulierter <i>Release</i> in Prozent (Gruppe 3- BMP). ....	52
Abbildung 12: rhVEGF <sub>165</sub> - Gesamtrelease der mit rhVEGF <sub>165</sub> beladenen Implantate (Gruppe 2). ....	53
Abbildung 13: Kumulierter <i>Release</i> in Prozent (Gruppe 2). ....	54
Abbildung 14: rhVEGF <sub>165</sub> - Gesamtrelease der mit rhVEGF <sub>165</sub> und rhBMP-2 beladenen Implantate (Gruppe 3-VEGF). ....	55
Abbildung 15: Kumulierter <i>Release</i> in Prozent (Gruppe 3- VEGF). ....	56
Abbildung 16: Alkalische Phosphatase- Aktivität der C2C12-Zellen (Gruppe 1). ....	58
Abbildung 17: Alkalische Phosphatase- Aktivität der C2C12-Zellen (Gruppe 3- BMP). ....	59
Abbildung 18: HUVEC- Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit rhVEGF <sub>165</sub> -Releasemedium (Gruppe 2). ....	61
Abbildung 19: HUVEC- Zellzahl nach 6 Tagen Inkubation mit rhVEGF <sub>165</sub> / rhBMP-2- Releasemedium (Gruppe 3- VEGF). ....	62

### 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht und Einteilung ausgewählter Knochenersatzmaterialien. ....	12
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Implantate. ....	34
Tabelle 3: Mittlere Freisetzungsniveau des rhBMP-2 über den gesamten Verlauf (Gruppe 1). .....	50
Tabelle 4: Mittlere Freisetzungsniveau des rhBMP-2 über den gesamten Verlauf (Gruppe 3- BMP). ....	52
Tabelle 5: Mittlere Freisetzungsniveau des rhVEGF <sub>165</sub> über den gesamten Verlauf (Gruppe 2). ....	54
Tabelle 6: Mittlere Freisetzungsniveau des rhVEGF <sub>165</sub> über den gesamten Verlauf (Gruppe 3- VEGF). ....	56
Tabelle 7: Mittlere AP Bildung der C2C12-Zellen (Gruppe 1). ....	59
Tabelle 8: Mittlere AP Bildung der C2C12-Zellen (Gruppe 3- BMP). ....	60

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

3-D	dreidimensional
μCT	Mikro- Computertomographie
aFGF	<i>acidic Fibroblast Growth Factor</i>
ALK-1-Rezeptor	<i>Aktivin Receptor-like Kinase-1-Rezeptor</i>
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	2,2'-Biquinoline -4,4'-dicarboxylic acid
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
Biolisa	<i>biological immunosorbant assay</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> oder Rinderserum-Albumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Essigsäure
Co- Smad	Common mediator SMAD
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	<i>Determined Osteogenetic Precursor Cell</i>
ECM	Extrazellulärmatrix
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
HA	Hydroxylapatit
HAP	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
IGF	<i>Insulin- Like Growth Factor</i>
IGFBP	<i>Insulin- Like Growth Factor Binding Protein</i>
IOPC	<i>Inducible Osteogenetic Precursor Cell</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
LN <sub>2</sub>	Stickstoff flüssig
max.	maximal
min	Minute
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet- Derived Growth Factor</i>
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polymilchsäure
PLGF	<i>Plazenta- Like Growth Factor</i>

---

PNM	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
p-NPP	Para-Nitrophenylphosphat
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PRP	<i>Platelet- Rich Plasma</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
R- SMAD	<i>Receptor-activated SMAD</i> oder Rezeptorabhängiger SMAD
rh	rekombinant
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SMAD	<i>Similar to Mothers against Decapentaplegic</i>
Std	Stunde
TCP	Tricalciumphosphat
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor- beta</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase</i>
TMB	Tetramethylbenzidine
TNS	<i>Trypsin Neutralization Solution</i>
TTCP	Tetracalciumphosphat
U/min	Umdrehung pro Minute
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor- Rezeptor</i>

## 7.4 Lösungen und Chemikalien

**Tabelle: EGM®-2 BulletKit®.**

hEGF (h <i>Epidermal Growth Factor</i> )
Hydrocortison
GA-1000 (Gentamycin, Amphotericin- B)
FBS 10ml
hFGF- B (h <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
R <sup>3</sup> -IGF-1
Ascorbinsäure
Heparin
VEGF

**Tabelle: BMP ELISA.**

Standard	Bac-rhBMP-2-Standard, lyophilisiert, 1 ml, 10 ng/ml
Waschpuffer	30 ml Konzentrat auf 1500 ml deionisiertes (destilliertes) Wasser
Antiserumlösung	Bac-rhBMP-2-Antiserum, in Glycerin-Puffer, 6 ml Testpuffer mit 60 µl der Stammlösung
Tracerlösung	Biotinyl-Bac-rhBMP-2 ist in Glycerin-Puffer gelöst, 6 ml Testpuffer mit 30 µl der Glycerinhaltigen Stammlösung versetzen
Substrat	Tetramethylbenzidine (TMB)- Substrat, gebrauchsfertig
Stopplösung	1M Salzsäure (HCl)
Enzymlösung	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, gebrauchsfertig

**Tabelle: VEGF Elisa: Puffer und Lösungen.**

Waschpuffer	50 ml PBS, 1% Tween 20 + 950 ml Aqua dest.
Stopplösung	1 M Phosphorsäure
Biotin- Konjugat	0,12 ml Biotin-Konjugat + 11,88 ml Probenpuffer
Streptavidin- HRP	0,12 ml Streptavidin- HRP + 11,88 ml Probenpuffer
Substratlösung	Tetramethylbenzidin
Probenpuffer	5 ml PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA + 95 ml Aqua dest.

**Tabelle: Puffer und Lösungen für Durchführung des Biolisa.**

Waschpuffer	50 ml PBS, 1% Tween 20 + 950 ml Aqua. dest.
Probenpuffer	5 ml PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA + 95 ml Aqua dest.
Biotin- Konjugat	0,06 ml Biotin-Konjugat + 5,94 ml Probenpuffer
Streptavidin- HRP	0,06 ml Streptavidin- HRP + 11,94 ml Probenpuffer
Substratlösung	Tetramethylbenzidin (TMB)- Substrat
Stopplösung	1 M Phosphorsäure

**Tabelle: ALP- Assay.**

Mangelmedium	DMEM, low glucose (1 g/l), 2% FKS, 2% Gentamycin
ALP- Puffer:	100 mM Glycin, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM ZnCl <sub>2</sub> pH 9,6
Lysepuffer:	1%-ige Lösung von IGEPAL <sup>®</sup> Ca-630
Substratlösung:	1 Tablette 4- Nitrophenylphosphat (pNPP, 20mg) in 10ml ALP Puffer lösen

**Tabelle: BCA- Assay.**

BCA- Lösung 1	enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA- Detektionsreagenz und Natriumtartrat in 0.1 M NaOH
BCA- Lösung 2	4%ige Kupfersulfatlösung
BCA- Arbeitsreagenz	10 ml von BCA-Lösung 1 werden kurz vor dem Versuch mit 0.2 ml von BCA-Lösung 2 vermischt
Standard	BSA (2 mg/ml) in 0.9% Salzlösung und 0.5% Natriumazid

## 7.5 Rohdaten

**Tabelle: BMP Release.**

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrA	001 Std	200	200	Well 1	49,28 2	34,414		41,848	0,003487 33	0,003487 33
BMP - GrA	001 Std	200	200	Well 2	50,68 3	38,696		44,6895	0,003724 13	0,003724 13
BMP - GrA	001 Std	200	200	Well 3	40,54 1	42,937		41,739	0,003478 25	0,003478 25
BMP - GrA	001 Std	400	400	Well 1	63,71 6	50,703		57,2095	0,002383 73	0,002383 73
BMP - GrA	001 Std	400	400	Well 2	57,60 2	62,324		59,963	0,002498 46	0,002498 46
BMP - GrA	001 Std	400	400	Well 3	58,97 2	54,835		56,9035	0,002370 98	0,002370 98

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrA	001 Std	800	800	Well 1	188,3 3	156,68		172,505	0,003593 85	0,003593 85
BMP - GrA	001 Std	800	800	Well 2	143,0 5	189,55		166,3	0,003464 58	0,003464 58
BMP - GrA	001 Std	800	800	Well 3	123,5 4	166,2		144,87	0,003018 13	0,003018 13
BMP - GrA	001 Std	1600	1600	Well 1	292,6	279,52		286,06	0,002979 79	0,002979 79
BMP - GrA	001 Std	1600	1600	Well 2	408,0 1	396,93		402,47	0,004192 4	0,004192 4
BMP - GrA	001 Std	1600	1600	Well 3	215,8 4	269,96		242,9	0,002530 21	0,002530 21
BMP - GrA	001 Std	0	0	Well 1	2,104 5	1,5793		1,8419		
BMP - GrA	001 Std	0	0	Well 2	3,545 4	3,1784		3,3619		
BMP - GrA	001 Std	0	0	Well 3	1,739 7	3,0949		2,4173		
BMP - GrA	012 Std	200	200	Well 1	34,97 9	20,006		27,4925	0,002291 04	0,005778 38
BMP - GrA	012 Std	200	200	Well 2	35,36 3	13,255		24,309	0,002025 75	0,005749 88
BMP - GrA	012 Std	200	200	Well 3	25,65	10,903		18,2765	0,001523 04	0,005001 29
BMP - GrA	012 Std	400	400	Well 1	34,19 6	40,523		37,3595	0,001556 65	0,003940 38
BMP - GrA	012 Std	400	400	Well 2	45,78 1	39,216		42,4985	0,001770 77	0,004269 23
BMP - GrA	012 Std	400	400	Well 3	57,37 5	49,557		53,466	0,002227 75	0,004598 73
BMP - GrA	012 Std	800	800	Well 1	126,8 9	151,1		138,995	0,002895 73	0,006489 58
BMP - GrA	012 Std	800	800	Well 2	189,3 3	110,16		149,745	0,003119 69	0,006584 27
BMP - GrA	012 Std	800	800	Well 3	200,7 9	195,19		197,99	0,004124 79	0,007142 92
BMP - GrA	012 Std	1600	1600	Well 1	177,8 8	295,96		236,92	0,002467 92	0,005447 71
BMP - GrA	012 Std	1600	1600	Well 2	399,2 9	675,89		537,59	0,005599 9	0,009792 29
BMP - GrA	012 Std	1600	1600	Well 3	354,4 3	462,87		408,65	0,004256 77	0,006786 98
BMP - GrA	012 Std	0	0	Well 1	1,887 9	1,3963		1,6421		
BMP - GrA	012 Std	0	0	Well 2	1,439 9	2,303		1,87145		
BMP - GrA	012 Std	0	0	Well 3	0,287 6	0,67048		0,47904		
BMP - GrA	024 Std	200	200	Well 1	29,59 8	36,885		33,2415	0,002770 13	0,008548 5
BMP - GrA	024 Std	200	200	Well 2	25,34 9	31,158		28,2535	0,002354 46	0,008104 33
BMP - GrA	024 Std	200	200	Well 3	106,4 4	107,41		106,925	0,008910 42	0,013911 71
BMP - GrA	024 Std	400	400	Well 1	38,32 5	46,573		42,449	0,001768 71	0,005709 08
BMP - GrA	024 Std	400	400	Well 2	41,29 2	46,167		43,7295	0,001822 06	0,006091 29
BMP - GrA	024 Std	400	400	Well 3	132,9 1	142,18		137,545	0,005731 04	0,010329 77
BMP - GrA	024 Std	800	800	Well 1	141,2 9	138,47		139,88	0,002914 17	0,009403 75
BMP - GrA	024 Std	800	800	Well 2	164,2 2	190,51		177,365	0,003695 1	0,010279 38
BMP - GrA	024 Std	800	800	Well 3	164,3 8	156,52		160,45	0,003342 71	0,010485 63
BMP - GrA	024 Std	1600	1600	Well 1	378,3	400,62		389,46	0,004056 88	0,009504 58
BMP - GrA	024 Std	1600	1600	Well 2	1302, 1	1498,7		1400,4	0,014587 5	0,024379 79
BMP - GrA	024 Std	1600	1600	Well 3	753,1 4	668,64		710,89	0,007405 1	0,014192 08

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
BMP - GrA	024 Std	0	0	Well 1	1,946	1,249		1,5975		
BMP - GrA	024 Std	0	0	Well 2	4,132 9	1,4892		2,81105		
BMP - GrA	024 Std	0	0	Well 3	8,299 3	2,1625		5,2309		
BMP - GrA	072 Std	200	200	Well 1	111,6 7	112,94		112,305	0,009358 75	0,017907 25
BMP - GrA	072 Std	200	200	Well 2	121,0 5	122,04		121,545	0,010128 75	0,018233 08
BMP - GrA	072 Std	200	200	Well 3	116,3 9	115,93		116,16	0,00968	0,023591 71
BMP - GrA	072 Std	400	400	Well 1	142,2 2	183,23		162,725	0,006780 21	0,012489 29
BMP - GrA	072 Std	400	400	Well 2	145,9 3	145,93		145,93	0,006080 42	0,012171 71
BMP - GrA	072 Std	400	400	Well 3	163,2 6	180,22		171,74	0,007155 83	0,017485 6
BMP - GrA	072 Std	800	800	Well 1	425,8 6	429,36		427,61	0,008908 54	0,018312 29
BMP - GrA	072 Std	800	800	Well 2	640,5 5	628,61		634,58	0,013220 42	0,023499 79
BMP - GrA	072 Std	800	800	Well 3	469,0 8	456,16		462,62	0,009637 92	0,020123 54
BMP - GrA	072 Std	1600	1600	Well 1	1048, 9	1098,6		1073,75	0,011184 9	0,020689 48
BMP - GrA	072 Std	1600	1600	Well 2	1965, 1	1872,3		1918,7	0,019986 46	0,044366 25
BMP - GrA	072 Std	1600	1600	Well 3	1772, 7	1765,1		1768,9	0,018426 04	0,032618 13
BMP - GrA	072 Std	0	0	Well 1	9,349	4,7947		7,07185		
BMP - GrA	072 Std	0	0	Well 2	6,391 7	2,364		4,37785		
BMP - GrA	072 Std	0	0	Well 3	7,682 4	2,1098		4,8961		
BMP - GrA	144 Std	200	200	Well 1	103,3 9	114,88		109,135	0,009094 58	0,027001 83
BMP - GrA	144 Std	200	200	Well 2	110,2 7	97,036		103,653	0,008637 75	0,026870 83
BMP - GrA	144 Std	200	200	Well 3	105,6 1	110,72		108,165	0,009013 75	0,032605 46
BMP - GrA	144 Std	400	400	Well 1	104,1 5	135,92		120,035	0,005001 46	0,017490 75
BMP - GrA	144 Std	400	400	Well 2	115,1 9	147,83		131,51	0,005479 58	0,017651 29
BMP - GrA	144 Std	400	400	Well 3	159,5 7	176,15		167,86	0,006994 17	0,024479 77
BMP - GrA	144 Std	800	800	Well 1	345,8 6	313,95		329,905	0,006873 02	0,025185 31
BMP - GrA	144 Std	800	800	Well 2	761,0 9	675,3		718,195	0,014962 4	0,038462 19
BMP - GrA	144 Std	800	800	Well 3	475,5 6	523,76		499,66	0,010409 58	0,030533 13
BMP - GrA	144 Std	1600	1600	Well 1	1746, 6	1920,9		1833,75	0,019101 56	0,039791 04
BMP - GrA	144 Std	1600	1600	Well 2	1542, 1	1278,8		1410,45	0,014692 19	0,059058 44
BMP - GrA	144 Std	1600	1600	Well 3	1430, 6	1396,4		1413,5	0,014723 96	0,047342 08
BMP - GrA	144 Std	0	0	Well 1	8,243 2	3,2238		5,7335		
BMP - GrA	144 Std	0	0	Well 2	6,353 2	1,3591		3,85615		
BMP - GrA	144 Std	0	0	Well 3	6,758	1,7674		4,2627		
BMP - GrA	216 Std	200	200	Well 1	118,5 1	89,852		104,181	0,008681 75	0,035683 58
BMP - GrA	216 Std	200	200	Well 2	6,358 6	15,52		10,9393	0,000911 61	0,027782 44
BMP - GrA	216 Std	200	200	Well 3	14,36 5	9,3085		11,83675	0,000986 4	0,033591 85

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrA	216 Std	400	400	Well 1	108,3 9	126,42		117,405	0,004891 88	0,022382 63
BMP - GrA	216 Std	400	400	Well 2	94,51 1	97,82		96,1655	0,004006 9	0,021658 19
BMP - GrA	216 Std	400	400	Well 3	93,04 5	101,04		97,0425	0,004043 44	0,028523 21
BMP - GrA	216 Std	800	800	Well 1	187,3 8	278,43		232,905	0,004852 19	0,030037 5
BMP - GrA	216 Std	800	800	Well 2	372,9 9	410,9		391,945	0,008165 52	0,046627 71
BMP - GrA	216 Std	800	800	Well 3	305,9 5	336,38		321,165	0,006690 94	0,037224 06
BMP - GrA	216 Std	1600	1600	Well 1	1844, 9	1343,9		1594,4	0,016608 33	0,056399 38
BMP - GrA	216 Std	1600	1600	Well 2	1456, 8	1290,1		1373,45	0,014306 77	0,073365 21
BMP - GrA	216 Std	1600	1600	Well 3	1434, 6	1381,7		1408,15	0,014668 23	0,062010 31
BMP - GrA	216 Std	0	0	Well 1	1,307 8	1,3802		1,344		
BMP - GrA	216 Std	0	0	Well 2	0,173 55	0,20181		0,18768		
BMP - GrA	216 Std	0	0	Well 3	0,863 18	0,72914		0,79616		
BMP - GrA	288 Std	200	200	Well 1	37,65 4	28,498		33,076	0,002756 33	0,038439 92
BMP - GrA	288 Std	200	200	Well 2	25,27 4	25,18		25,227	0,002102 25	0,029884 69
BMP - GrA	288 Std	200	200	Well 3	15,65	19,21		17,43	0,001452 5	0,035044 35
BMP - GrA	288 Std	400	400	Well 1	45,69 7	38,957		42,327	0,001763 63	0,024146 25
BMP - GrA	288 Std	400	400	Well 2	48,79	41,96		45,375	0,001890 63	0,023548 81
BMP - GrA	288 Std	400	400	Well 3	34,95	39,47		37,21	0,001550 42	0,030073 63
BMP - GrA	288 Std	800	800	Well 1	105,2 1	102,76		103,985	0,002166 35	0,032203 85
BMP - GrA	288 Std	800	800	Well 2	139,5 2	180,45		159,985	0,003333 02	0,049960 73
BMP - GrA	288 Std	800	800	Well 3	193,1 9	235,44		214,315	0,004464 9	0,041688 96
BMP - GrA	288 Std	1600	1600	Well 1	424,7 5	454,72		439,735	0,004580 57	0,060979 95
BMP - GrA	288 Std	1600	1600	Well 2	1568, 4	1456,8		1512,6	0,015756 25	0,089121 46
BMP - GrA	288 Std	1600	1600	Well 3	875,8	924,07		899,935	0,009374 32	0,071384 64
BMP - GrA	288 Std	0	0	Well 1	1,197 4	1,1521		1,17475		
BMP - GrA	288 Std	0	0	Well 2	0,282 57	0,30201		0,29229		
BMP - GrA	288 Std	0	0	Well 3	0,389 14	0,19874		0,29394		
BMP - GrA	360 Std	200	200	Well 1	38,98 9	21,325		30,157	0,002513 08	0,040953
BMP - GrA	360 Std	200	200	Well 2	29,75	27,64		28,695	0,002391 25	0,032275 94
BMP - GrA	360 Std	200	200	Well 3	24,93	26,76		25,845	0,002153 75	0,037198 1
BMP - GrA	360 Std	400	400	Well 1	6,096 4	5,34		5,7182	0,000238 26	0,024384 51
BMP - GrA	360 Std	400	400	Well 2	5,197	4,99		5,0935	0,000212 23	0,023761 04
BMP - GrA	360 Std	400	400	Well 3	6,940 2	5,46		6,2001	0,000258 34	0,030331 96
BMP - GrA	360 Std	800	800	Well 1	25,04 3	40,827		32,935	0,000686 15	0,03289
BMP - GrA	360 Std	800	800	Well 2	33,49	36,71		35,1	0,000731 25	0,050691 98
BMP - GrA	360 Std	800	800	Well 3	29,99	27,98		28,985	0,000603 85	0,042292 81



Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrA	360 Std	1600	1600	Well 1	158,4 4	192,15		175,295	0,001825 99	0,062805 94
BMP - GrA	360 Std	1600	1600	Well 2	483,9 7	499,6		491,785	0,005122 76	0,094244 22
BMP - GrA	360 Std	1600	1600	Well 3	251,0 2	245,36		248,19	0,002585 31	0,073969 95
BMP - GrA	360 Std	0	0	Well 1	1,660 8	1,7459		1,70335		
BMP - GrA	360 Std	0	0	Well 2	0,96	1,184		1,072		
BMP - GrA	360 Std	0	0	Well 3	0,175 32	0,11		0,14266		
BMP - GrA	432 Std	200	200	Well 1	14,68	16,47		15,575	0,001297 92	0,042250 92
BMP - GrA	432 Std	200	200	Well 2	13,11 5	12,93		13,0225	0,001085 21	0,033361 15
BMP - GrA	432 Std	200	200	Well 3	11,29	14,22		12,755	0,001062 92	0,038261 02
BMP - GrA	432 Std	400	400	Well 1	11,44 4	20,722		16,083	0,000670 13	0,025054 63
BMP - GrA	432 Std	400	400	Well 2	8,269 3	16,252		12,26065	0,000510 86	0,024271 9
BMP - GrA	432 Std	400	400	Well 3	0	13,043		6,5215	0,000271 73	0,030603 69
BMP - GrA	432 Std	800	800	Well 1	59,81 6	20,621		40,2185	0,000837 89	0,033727 89
BMP - GrA	432 Std	800	800	Well 2	129,3 2	58,54		93,93	0,001956 88	0,052648 85
BMP - GrA	432 Std	800	800	Well 3	50,82 3	29,453		40,138	0,000836 21	0,043129 02
BMP - GrA	432 Std	1600	1600	Well 1	211,5 1	159,46		185,485	0,001932 14	0,064738 07
BMP - GrA	432 Std	1600	1600	Well 2	435,6	510,16		472,88	0,004925 83	0,099170 05
BMP - GrA	432 Std	1600	1600	Well 3	203,0 4	131,3		167,17	0,001741 35	0,075711 3
BMP - GrA	432 Std	0	0	Well 1	1,649 9	1,0873		1,3686		
BMP - GrA	432 Std	0	0	Well 2	0,141 44	0,167		0,15422		
BMP - GrA	432 Std	0	0	Well 3	0,170 22	0,133		0,15161		
BMP - GrA	504 Std	200	200	Well 1	16,75 3	13,325		15,039	0,001253 25	0,043504 17
BMP - GrA	504 Std	200	200	Well 2	17,11	15,24		16,175	0,001347 92	0,034709 07
BMP - GrA	504 Std	200	200	Well 3	18,16 5	16,566		17,3655	0,001447 13	0,039708 15
BMP - GrA	504 Std	400	400	Well 1	13,17 7	24,711		18,944	0,000789 33	0,025843 97
BMP - GrA	504 Std	400	400	Well 2	11,64	17,34		14,49	0,000603 75	0,024875 65
BMP - GrA	504 Std	400	400	Well 3	18,99 8	40,729		29,8635	0,001244 31	0,031848
BMP - GrA	504 Std	800	800	Well 1	28,75 5	31,474		30,1145	0,000627 39	0,034355 27
BMP - GrA	504 Std	800	800	Well 2	0	56,139		28,0695	0,000584 78	0,053233 64
BMP - GrA	504 Std	800	800	Well 3	50,57 2	88,886		69,729	0,001452 69	0,044581 71
BMP - GrA	504 Std	1600	1600	Well 1	164,0 1	63,727		113,8685	0,001186 13	0,065924 2
BMP - GrA	504 Std	1600	1600	Well 2	218,1 7	123,08		170,625	0,001777 34	0,100947 4
BMP - GrA	504 Std	1600	1600	Well 3	117,6 4	89,641		103,6405	0,001079 59	0,076790 89
BMP - GrA	504 Std	0	0	Well 1	1,615	1,4868		1,5509		
BMP - GrA	504 Std	0	0	Well 2	0	0		0		
BMP - GrA	504 Std	0	0	Well 3	0,233 04	1		0,61652		

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrA	576 Std	200	200	Well 1	14,64 4	14,914		14,779	0,001231 58	0,044735 75
BMP - GrA	576 Std	200	200	Well 2	24,32 1	12,22		18,2705	0,001522 54	0,036231 61
BMP - GrA	576 Std	200	200	Well 3	29,62 6	12,167		20,8965	0,001741 38	0,041449 52
BMP - GrA	576 Std	400	400	Well 1	26,78	32,916		29,848	0,001243 67	0,027087 63
BMP - GrA	576 Std	400	400	Well 2	27,52 9	28,709		28,119	0,001171 63	0,026047 28
BMP - GrA	576 Std	400	400	Well 3	19,79	31,717		25,7535	0,001073 06	0,032921 07
BMP - GrA	576 Std	800	800	Well 1	92,87 2	59,253		76,0625	0,001584 64	0,035939 91
BMP - GrA	576 Std	800	800	Well 2	106,1 7	95,257		100,7135	0,002098 2	0,055331 83
BMP - GrA	576 Std	800	800	Well 3	126,7 1	117,2		121,955	0,002540 73	0,047122 44
BMP - GrA	576 Std	1600	1600	Well 1	184,7 6	146,46		165,61	0,001725 1	0,067649 31
BMP - GrA	576 Std	1600	1600	Well 2	324,7 5	266,39		295,57	0,003078 85	0,104026 25
BMP - GrA	576 Std	1600	1600	Well 3	238,4 4	171,08		204,76	0,002132 92	0,078923 81
BMP - GrA	576 Std	0	0	Well 1	1,486 4	2,1569		1,82165		
BMP - GrA	576 Std	0	0	Well 2	0,428 42	2,0012		1,21481		
BMP - GrA	576 Std	0	0	Well 3	0,653 99	1,2275		0,940745		
BMP - GrA	648 Std	200	200	Well 1	31,60 5	35,297		33,451	0,002787 58	0,047523 33
BMP - GrA	648 Std	200	200	Well 2	29,41 5	9,8634		19,6392	0,001636 6	0,037868 21
BMP - GrA	648 Std	200	200	Well 3	100,3 4	119,49		109,915	0,009159 58	0,050609 1
BMP - GrA	648 Std	400	400	Well 1	11,69 6	23,775		17,7355	0,000738 98	0,027826 61
BMP - GrA	648 Std	400	400	Well 2	71,51 3	28,454		49,9835	0,002082 65	0,028129 92
BMP - GrA	648 Std	400	400	Well 3	41,47 9	46,858		44,1685	0,001840 35	0,034761 42
BMP - GrA	648 Std	800	800	Well 1	113,1 1	116,8		114,955	0,002394 9	0,038334 8
BMP - GrA	648 Std	800	800	Well 2	93,03 1	90,163		91,597	0,001908 27	0,057240 1
BMP - GrA	648 Std	800	800	Well 3	515,6 6	202,34		359	0,007479 17	0,054601 6
BMP - GrA	648 Std	1600	1600	Well 1	235,8 1	182,28		209,045	0,002177 55	0,069826 86
BMP - GrA	648 Std	1600	1600	Well 2	378,2 5	229,13		303,69	0,003163 44	0,107189 69
BMP - GrA	648 Std	1600	1600	Well 3	242,5 1	213,02		227,765	0,002372 55	0,081296 36
BMP - GrA	648 Std	0	0	Well 1	1,655	1,2704		1,4627		
BMP - GrA	648 Std	0	0	Well 2	0,520 62	1,1628		0,84171		
BMP - GrA	648 Std	0	0	Well 3	0,764 57	0,083851		0,424210 5		
BMP - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 1	35,67 1	36,516		36,0935	0,001503 9	0,001503 9
BMP - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 2	288,2 2	293,14		290,68	0,012111 67	0,012111 67
BMP - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 3	259,1 6	390,59		324,875	0,013536 46	0,013536 46
BMP - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 1	308,7	298,81		303,755	0,012656 46	0,012656 46
BMP - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 2	269,4 1	265,13		267,27	0,011136 25	0,011136 25
BMP - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 3	83,95 8	73,364		78,661	0,003277 54	0,003277 54

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
BMP - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 1	682,6 8	693,16		687,92	0,014331 67	0,014331 67
BMP - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 2	553,1 4	484,84		518,99	0,010812 29	0,010812 29
BMP - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 3	599,4 5	888,38		743,915	0,015498 23	0,015498 23
BMP - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 1	795,4 7	692,13		743,8	0,015495 83	0,015495 83
BMP - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 2	611,8 5	595,35		603,6	0,012575	0,012575
BMP - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 3	1199, 8	1161,4		1180,6	0,024595 83	0,024595 83
BMP - GrC	001 Std	0	0/0	Well 1	5,023	5,4819		5,25245		
BMP - GrC	001 Std	0	0/0	Well 2	7,595 2	7,8062		7,7007		
BMP - GrC	001 Std	0	0/0	Well 3	10,75 2	14,394		12,573		
BMP - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 1	38,19 9	49,058		43,6285	0,001817 85	0,003321 75
BMP - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 2	184,2 5	185,11		184,68	0,007695	0,019806 67
BMP - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 3	276,3 4	154,21		215,275	0,008969 79	0,022506 25
BMP - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 1	186,7 1	186,14		186,425	0,007767 71	0,020424 17
BMP - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 2	140,5 2	146,39		143,455	0,005977 29	0,017113 54
BMP - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 3	59,90 1	53,916		56,9085	0,002371 19	0,005648 73
BMP - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 1	451,1 8	588,33		519,755	0,010828 23	0,025159 9
BMP - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 2	473,8 8	410,37		442,125	0,009210 94	0,020023 23
BMP - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 3	320,2 7	263,21		291,74	0,006077 92	0,021576 15
BMP - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 1	423,8 7	385,12		404,495	0,008426 98	0,023922 81
BMP - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 2	195,3 6	253,28		224,32	0,004673 33	0,017248 33
BMP - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 3	453,2 6	499,18		476,22	0,009921 25	0,034517 08
BMP - GrC	012 Std	0	0/0	Well 1	5,177 3	6,1355		5,6564		
BMP - GrC	012 Std	0	0/0	Well 2	7,383 3	8,6392		8,01125		
BMP - GrC	012 Std	0	0/0	Well 3	10,47 9	6,7816		8,6303		
BMP - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 1	58,43	62,899		60,6645	0,002527 69	0,005849 44
BMP - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 2	118,2 9	121,39		119,84	0,004993 33	0,0248
BMP - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 3	221,8 3	180,31		201,07	0,008377 92	0,030884 17
BMP - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 1	194,6	174,29		184,445	0,007685 21	0,028109 38
BMP - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 2	110,6 7	106,36		108,515	0,004521 46	0,021635
BMP - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 3	91,07 6	89,189		90,1325	0,003755 52	0,009404 25
BMP - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 1	707,4 4	903,92		805,68	0,016785	0,041944 9
BMP - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 2	305,7 1	512,59		409,15	0,008523 96	0,028547 19
BMP - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 3	359,5 1	360,42		359,965	0,007499 27	0,029075 42
BMP - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 1	190,9 9	330,06		260,525	0,005427 6	0,029350 42
BMP - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 2	281,2 6	342,39		311,825	0,006496 35	0,023744 69
BMP - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 3	321,3 3	363,07		342,2	0,007129 17	0,041646 25

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrC	024 Std	0	0/0	Well 1	4,207 3	4,8792		4,54325		
BMP - GrC	024 Std	0	0/0	Well 2	5,365	6,1053		5,73515		
BMP - GrC	024 Std	0	0/0	Well 3	5,738 2	6,4956		6,1169		
BMP - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 1	192,6 4	179,98		186,31	0,007762 92	0,013612 35
BMP - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 2	222,6 2	213,73		218,175	0,009090 63	0,033890 63
BMP - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 3	472,1 2	467,39		469,755	0,019573 13	0,050457 29
BMP - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 1	289,0 2	306,11		297,565	0,012398 54	0,040507 92
BMP - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 2	244,8 9	226,09		235,49	0,009812 08	0,031447 08
BMP - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 3	333,4 1	325,13		329,27	0,013719 58	0,023123 83
BMP - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 1	575,9 3	565,75		570,84	0,011892 5	0,053837 4
BMP - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 2	1284, 9	1262		1273,45	0,026530 21	0,055077 4
BMP - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 3	990,0 3	987,88		988,955	0,020603 23	0,049678 65
BMP - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 1	800,8 6	702,95		751,905	0,015664 69	0,045015 1
BMP - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 2	887,2 2	890,4		888,81	0,018516 88	0,042261 56
BMP - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 3	865,6 5	950,66		908,155	0,018919 9	0,060566 15
BMP - GrC	072 Std	0	0/0	Well 1	4,938 2	4,3232		4,6307		
BMP - GrC	072 Std	0	0/0	Well 2	6,129 8	6,4482		6,289		
BMP - GrC	072 Std	0	0/0	Well 3	10,11 7	9,7392		9,9281		
BMP - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 1	490,5 7	546,95		518,76	0,021615	0,035227 35
BMP - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 2	317,5 9	316,78		317,185	0,013216 04	0,047106 67
BMP - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 3	635,5 1	721,61		678,56	0,028273 33	0,078730 63
BMP - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 1	472,4 4	481,63		477,035	0,019876 46	0,060384 38
BMP - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 2	478,0 2	460,31		469,165	0,019548 54	0,050995 63
BMP - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 3	1163, 1	1093,4		1128,25	0,047010 42	0,070134 25
BMP - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 1	1175, 1	1190		1182,55	0,024636 46	0,078473 85
BMP - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 2	923,1 7	958,36		940,765	0,019599 27	0,074676 67
BMP - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 3	1379, 7	1139,1		1259,4	0,026237 5	0,075916 15
BMP - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 1	653,6 2	639,07		646,345	0,013465 52	0,058480 63
BMP - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 2	578,2 1	631,83		605,02	0,012604 58	0,054866 15
BMP - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 3	1606, 3	1526		1566,15	0,032628 13	0,093194 27
BMP - GrC	144 Std	0	0/0	Well 1	4,047 8	4,0555		4,05165		
BMP - GrC	144 Std	0	0/0	Well 2	4,487 4	5,575		5,0312		
BMP - GrC	144 Std	0	0/0	Well 3	12,47 8	12,53		12,504		
BMP - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 1	161,8 3	141,28		151,555	0,006314 79	0,041542 15
BMP - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 2	257,4 5	241,23		249,34	0,010389 17	0,057495 83
BMP - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 3	544,9 5	464,34		504,645	0,021026 88	0,099757 5

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	Kumuliert
BMP - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 1	307,3 5	311,59		309,47	0,012894 58	0,073278 96
BMP - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 2	168,1	165,78		166,94	0,006955 83	0,057951 46
BMP - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 3	170,1 7	134,42		152,295	0,006345 63	0,076479 88
BMP - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 1	1050	902,09		976,045	0,020334 27	0,098808 13
BMP - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 2	1478	1622,8		1550,4	0,0323	0,106976 67
BMP - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 3	789,3 4	720,68		755,01	0,015729 38	0,091645 52
BMP - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 1	520,5 7	566,44		543,505	0,011323 02	0,069803 65
BMP - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 2	633,8 5	518,5		576,175	0,012003 65	0,066869 79
BMP - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 3	889,4 2	993,32		941,37	0,019611 88	0,112806 15
BMP - GrC	216 Std	0	0/0	Well 1	1,934 2	1,7785		1,85635		
BMP - GrC	216 Std	0	0/0	Well 2	0,824 74	0,74276		0,78375		
BMP - GrC	216 Std	0	0/0	Well 3	4,505 8	4,9327		4,71925		
BMP - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 1	262,2 5	316,43		289,34	0,012055 83	0,053597 98
BMP - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 2	165,6 9	183,81		174,75	0,007281 25	0,064777 08
BMP - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 3	280,0 8	293,15		286,615	0,011942 29	0,111699 79
BMP - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 1	270,6 3	277,22		273,925	0,011413 54	0,084692 5
BMP - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 2	299,1 9	285,57		292,38	0,012182 5	0,070133 96
BMP - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 3	195,9 9	188,04		192,015	0,008000 63	0,084480 5
BMP - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 1	483,5 3	498,36		490,945	0,010228 02	0,109036 15
BMP - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 2	382,7 7	315,16		348,965	0,007270 1	0,114246 77
BMP - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 3	289,2	246,17		267,685	0,005576 77	0,097222 29
BMP - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 1	373,3 5	274,77		324,06	0,006751 25	0,076554 9
BMP - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 2	409,8 1	362,51		386,16	0,008045	0,074914 79
BMP - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 3	419,8	367,26		393,53	0,008198 54	0,121004 69
BMP - GrC	288 Std	0	0/0	Well 1	1,167 1	1,6245		1,3958		
BMP - GrC	288 Std	0	0/0	Well 2	2,685 8	3,7831		3,23445		
BMP - GrC	288 Std	0	0/0	Well 3	2,349	9,5343		5,94165		
BMP - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 1	198,3 7	221,8		210,085	0,008753 54	0,062351 52
BMP - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 2	154,4	152,69		153,545	0,006397 71	0,071174 79
BMP - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 3	236,5 7	235,67		236,12	0,009838 33	0,121538 13
BMP - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 1	213,2 2	165,35		189,285	0,007886 88	0,092579 38
BMP - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 2	278,7 4	206,97		242,855	0,010118 96	0,080252 92
BMP - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 3	176,4 3	146,07		161,25	0,006718 75	0,091199 25
BMP - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 1	296,5 9	295,63		296,11	0,006168 96	0,115205 1
BMP - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 2	529,1 4	481,79		505,465	0,010530 52	0,124777 29
BMP - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 3	410,7 2	370,33		390,525	0,008135 94	0,105358 23

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
BMP - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 1	202,9 6	176,77		189,865	0,003955 52	0,080510 42
BMP - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 2	276,0 3	269,28		272,655	0,005680 31	0,080595 1
BMP - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 3	144,2 3	121,92		133,075	0,002772 4	0,123777 08
BMP - GrC	360 Std	0	0/0	Well 1	0,167 6	0,34768		0,25764		
BMP - GrC	360 Std	0	0/0	Well 2	2,366 3	2,5942		2,48025		
BMP - GrC	360 Std	0	0/0	Well 3	9,554 6	9,3393		9,44695		
BMP - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 1	259,1 7	281,66		270,415	0,011267 29	0,073618 81
BMP - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 2	100,9	109,6		105,25	0,004385 42	0,075560 21
BMP - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 3	106,9 5	110,42		108,685	0,004528 54	0,126066 67
BMP - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 1	145,6 5	115,15		130,4	0,005433 33	0,098012 71
BMP - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 2	152,7 3	120,26		136,495	0,005687 29	0,085940 21
BMP - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 3	153,1 1	140,44		146,775	0,006115 63	0,097314 88
BMP - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 1	336,4 1	358,31		347,36	0,007236 67	0,122441 77
BMP - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 2	229,6 3	197,29		213,46	0,004447 08	0,129224 38
BMP - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 3	273,9 8	270,42		272,2	0,005670 83	0,111029 06
BMP - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 1	133,0 8	116,12		124,6	0,002595 83	0,083106 25
BMP - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 2	192,2 6	187,94		190,1	0,003960 42	0,084555 52
BMP - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 3	194,7 8	189,68		192,23	0,004004 79	0,127781 88
BMP - GrC	432 Std	0	0/0	Well 1	0,243 71	0,30735		0,27553		
BMP - GrC	432 Std	0	0/0	Well 2	2,956 7	1,7932		2,37495		
BMP - GrC	432 Std	0	0/0	Well 3	6,978 1	5,4651		6,2216		
BMP - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 1	593,1 8	631,58		612,38	0,025515 83	0,099134 65
BMP - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 2	183,5 7	182,38		182,975	0,007623 96	0,083184 17
BMP - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 3	123,8 7	92,621		108,2455	0,004510 23	0,130576 9
BMP - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 1	132,8 2	118,47		125,645	0,005235 21	0,103247 92
BMP - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 2	231,0 4	245,07		238,055	0,009918 96	0,095859 17
BMP - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 3	293,7	296,59		295,145	0,012297 71	0,109612 58
BMP - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 1	285,6 8	258,7		272,19	0,005670 63	0,128112 4
BMP - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 2	256,9 2	322,97		289,945	0,006040 52	0,135264 9
BMP - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 3	485,6 6	260,56		373,11	0,007773 13	0,118802 19
BMP - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 1	211,6 3	234,09		222,86	0,004642 92	0,087749 17
BMP - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 2	350,8 1	359,77		355,29	0,007401 88	0,091957 4
BMP - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 3	410,8 4	365,39		388,115	0,008085 73	0,135867 6
BMP - GrC	504 Std	0	0/0	Well 1	0,967 9	0,1243		0,5461		
BMP - GrC	504 Std	0	0/0	Well 2	3,033 2	2,3155		2,67435		
BMP - GrC	504 Std	0	0/0	Well 3	6,150 4	4,9968		5,5736		

Ver-such	Zeit-punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
BMP - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 1	531,93	474,3		503,115	0,02096313	0,12009777
BMP - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 2	189,75	165,37		177,56	0,00739833	0,0905825
BMP - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 3	209,71	209,48		209,595	0,00873313	0,13931002
BMP - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 1	164,28	153,65		158,965	0,00662354	0,10987146
BMP - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 2	147,43	118,59		133,01	0,00554208	0,10140125
BMP - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 3	141,59	137,28		139,435	0,00580979	0,11542238
BMP - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 1	402,86	421,27		412,065	0,00858469	0,13669708
BMP - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 2	342,03	336,07		339,05	0,00706354	0,14232844
BMP - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 3	346,63	408,29		377,46	0,00786375	0,12666594
BMP - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 1	161,73	146,97		154,35	0,00321563	0,09096479
BMP - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 2	294,49	272,85		283,67	0,00590979	0,09786719
BMP - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 3	298,62	317,5		308,06	0,00641792	0,14228552
BMP - GrC	576 Std	0	0/0	Well 1	0,64828	0,5839		0,61609		
BMP - GrC	576 Std	0	0/0	Well 2	2,2664	2,1184		2,1924		
BMP - GrC	576 Std	0	0/0	Well 3	9,9941	8,9697		9,4819		
BMP - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 1	130,74	101,81		116,275	0,00484479	0,12494256
BMP - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 2	158,6	173,53		166,065	0,00691938	0,09750188
BMP - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 3	165,52	173,43		169,475	0,00706146	0,14637148
BMP - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 1	119,61	104,94		112,275	0,00467813	0,11454958
BMP - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 2	210,46	190,04		200,25	0,00834375	0,109745
BMP - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 3	167,82	177,87		172,845	0,00720188	0,12262425
BMP - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 1	348,67	378,72		363,695	0,00757698	0,14427406
BMP - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 2	261,79	310,53		286,16	0,00596167	0,1482901
BMP - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 3	407,74	381,03		394,385	0,00821635	0,13488229
BMP - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 1	174,39	172,45		173,42	0,00361292	0,09457771
BMP - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 2	317,72	306,51		312,115	0,0065024	0,10436958
BMP - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 3	253,88	140,71		197,295	0,00411031	0,14639583
BMP - GrC	648 Std	0	0/0	Well 1	1,4606	0,93361		1,197105		
BMP - GrC	648 Std	0	0/0	Well 2	2,3335	2,0852		2,20935		
BMP - GrC	648 Std	0	0/0	Well 3	5,7462	5,892		5,8191		

Tabelle: VEGF Release.

Ver-such	Zeit-punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	001 Std	0,004	4	Well 1	0,049246	0,089286		0,069266	0,00028861	0,00028861
VEGF - GrB	001 Std	0,004	4	Well 2	0,66244	0,446		0,55422	0,00230925	0,00230925

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	001 Std	0,004	4	Well 3	4,248 8	6,8983		5,57355	0,023223 13	0,023223 13
VEGF - GrB	001 Std	0,025	25	Well 1	2,334 8	2,5564		2,4456	0,001630 4	0,001630 4
VEGF - GrB	001 Std	0,025	25	Well 2	0,860 28	0,87108		0,86568	0,000577 12	0,000577 12
VEGF - GrB	001 Std	0,025	25	Well 3	0,499 1	0,53421		0,516655	0,000344 44	0,000344 44
VEGF - GrB	001 Std	0,1	100	Well 1	43,54 9	42,535		43,042	0,007173 67	0,007173 67
VEGF - GrB	001 Std	0,1	100	Well 2	28,26 3	29,883		29,073	0,004845 5	0,004845 5
VEGF - GrB	001 Std	0,1	100	Well 3	49,05 1	51,666		50,3585	0,008393 08	0,008393 08
VEGF - GrB	001 Std	0,4	400	Well 1	277,9 8	256,63		267,305	0,011137 71	0,011137 71
VEGF - GrB	001 Std	0,4	400	Well 2	346,2 1	362,67		354,44	0,014768 33	0,014768 33
VEGF - GrB	001 Std	0,4	400	Well 3	301,2 3	310,64		305,935	0,012747 29	0,012747 29
VEGF - GrB	001 Std	0	0	Well 1	0,082 778	0,09625		0,089514		
VEGF - GrB	001 Std	0	0	Well 2	0,127 48	0,13442		0,13095		
VEGF - GrB	001 Std	0	0	Well 3	0,157 06	0,16644		0,16175		
VEGF - GrB	012 Std	0,004	4	Well 1	4,449 2	5,5453		4,99725	0,020821 88	0,021110 48
VEGF - GrB	012 Std	0,004	4	Well 2	5,347 3	5,0594		5,20335	0,021680 63	0,023989 88
VEGF - GrB	012 Std	0,004	4	Well 3	5,584 5	7,1298		6,35715	0,026488 13	0,049711 25
VEGF - GrB	012 Std	0,025	25	Well 1	13,75 9	10,667		12,213	0,008142	0,009772 4
VEGF - GrB	012 Std	0,025	25	Well 2	14,47 7	17,751		16,114	0,010742 67	0,011319 79
VEGF - GrB	012 Std	0,025	25	Well 3	16,14 9	16,445		16,297	0,010864 67	0,011209 1
VEGF - GrB	012 Std	0,1	100	Well 1	246,0 2	246,24		246,13	0,041021 67	0,048195 33
VEGF - GrB	012 Std	0,1	100	Well 2	182,6 1	232,8		207,705	0,034617 5	0,039463
VEGF - GrB	012 Std	0,1	100	Well 3	221,4 6	273,93		247,695	0,041282 5	0,049675 58
VEGF - GrB	012 Std	0,4	400	Well 1	1114, 5	1180,2		1147,35	0,047806 25	0,058943 96
VEGF - GrB	012 Std	0,4	400	Well 2	1687, 2	1713,9		1700,55	0,070856 25	0,085624 58
VEGF - GrB	012 Std	0,4	400	Well 3	1585, 5	1298,2		1441,85	0,060077 08	0,072824 38
VEGF - GrB	012 Std	0	0	Well 1	0,956 85	1,0403		0,998575		
VEGF - GrB	012 Std	0	0	Well 2	0,838 41	0,90986		0,874135		
VEGF - GrB	012 Std	0	0	Well 3	1,288 5	1,1889		1,2387		
VEGF - GrB	024 Std	0,004	4	Well 1	0,950 65	0,81796		0,884305	0,003684 6	0,024795 09
VEGF - GrB	024 Std	0,004	4	Well 2	0,459 64	0,48085		0,470245	0,001959 35	0,025949 23
VEGF - GrB	024 Std	0,004	4	Well 3	0,452 68	0,45515		0,453915	0,001891 31	0,051602 56
VEGF - GrB	024 Std	0,025	25	Well 1	4,044 6	3,9969		4,02075	0,002680 5	0,012452 9
VEGF - GrB	024 Std	0,025	25	Well 2	4,533 7	4,5495		4,5416	0,003027 73	0,014347 52
VEGF - GrB	024 Std	0,025	25	Well 3	3,842 1	3,7064		3,77425	0,002516 17	0,013725 27
VEGF - GrB	024 Std	0,1	100	Well 1	188,5 4	180,59		184,565	0,030760 83	0,078956 17
VEGF - GrB	024 Std	0,1	100	Well 2	287,9 7	234,3		261,135	0,043522 5	0,082985 5



Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	024 Std	0,1	100	Well 3	268,7 6	282,66		275,71	0,045951 67	0,095627 25
VEGF - GrB	024 Std	0,4	400	Well 1	1382	1399,7		1390,85	0,057952 08	0,116896 04
VEGF - GrB	024 Std	0,4	400	Well 2	1116, 4	1012		1064,2	0,044341 67	0,129966 25
VEGF - GrB	024 Std	0,4	400	Well 3	890,9 8	920,93		905,955	0,037748 13	0,110572 5
VEGF - GrB	024 Std	0	0	Well 1	0,305 61	0,42018		0,362895		
VEGF - GrB	024 Std	0	0	Well 2	0,267 45	0,26441		0,26593		
VEGF - GrB	024 Std	0	0	Well 3	0,697 16	0,69751		0,697335		
VEGF - GrB	072 Std	0,004	4	Well 1	5,780 2	8,7528		7,2665	0,030277 08	0,055072 17
VEGF - GrB	072 Std	0,004	4	Well 2	6,088 8	7,954		7,0214	0,029255 83	0,055205 06
VEGF - GrB	072 Std	0,004	4	Well 3	5,441 7	8,9102		7,17595	0,029899 79	0,081502 35
VEGF - GrB	072 Std	0,025	25	Well 1	21,79 8	22,039		21,9185	0,014612 33	0,027065 23
VEGF - GrB	072 Std	0,025	25	Well 2	22,76 1	21,506		22,1335	0,014755 67	0,029103 19
VEGF - GrB	072 Std	0,025	25	Well 3	21,20 5	16,904		19,0545	0,012703	0,026428 27
VEGF - GrB	072 Std	0,1	100	Well 1	485,6 4	475,34		480,49	0,080081 67	0,159037 83
VEGF - GrB	072 Std	0,1	100	Well 2	411,7 4	412,47		412,105	0,068684 17	0,151669 67
VEGF - GrB	072 Std	0,1	100	Well 3	438,3 8	448,12		443,25	0,073875	0,169502 25
VEGF - GrB	072 Std	0,4	400	Well 1	1548, 6	1429,3		1488,95	0,062039 58	0,178935 63
VEGF - GrB	072 Std	0,4	400	Well 2	1489, 1	1176,3		1332,7	0,055529 17	0,185495 42
VEGF - GrB	072 Std	0,4	400	Well 3	1482, 4	993,59		1237,995	0,051583 13	0,162155 63
VEGF - GrB	072 Std	0	0	Well 1	0,967	1,2731		1,12005		
VEGF - GrB	072 Std	0	0	Well 2	0,699 03	0,84001		0,76952		
VEGF - GrB	072 Std	0	0	Well 3	0,486 4	0,73256		0,60948		
VEGF - GrB	144 Std	0,004	4	Well 1	0,799 74	0,84542		0,82258	0,003427 42	0,058499 59
VEGF - GrB	144 Std	0,004	4	Well 2	7,411 2	7,9272		7,6692	0,031955	0,087160 06
VEGF - GrB	144 Std	0,004	4	Well 3	0,814 92	0,81482		0,81487	0,003395 29	0,084897 65
VEGF - GrB	144 Std	0,025	25	Well 1	8,425 3	9,0174		8,72135	0,005814 23	0,032879 47
VEGF - GrB	144 Std	0,025	25	Well 2	1,289 1	1,3006		1,29485	0,000863 23	0,029966 42
VEGF - GrB	144 Std	0,025	25	Well 3	8,563 2	8,5049		8,53405	0,005689 37	0,032117 64
VEGF - GrB	144 Std	0,1	100	Well 1	421,5 8	418,01		419,795	0,069965 83	0,229003 67
VEGF - GrB	144 Std	0,1	100	Well 2	328,8 3	324,07		326,45	0,054408 33	0,206078
VEGF - GrB	144 Std	0,1	100	Well 3	388,2 4	339,53		363,885	0,060647 5	0,230149 75
VEGF - GrB	144 Std	0,4	400	Well 1	701,5 6	713,05		707,305	0,029471 04	0,208406 67
VEGF - GrB	144 Std	0,4	400	Well 2	540,3 8	517,4		528,89	0,022037 08	0,207532 5
VEGF - GrB	144 Std	0,4	400	Well 3	480,9 5	411,9		446,425	0,018601 04	0,180756 67
VEGF - GrB	144 Std	0	0	Well 1	0,518 3	0,51793		0,518115		
VEGF - GrB	144 Std	0	0	Well 2	0,367 3	0,37878		0,37304		

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	144 Std	0	0	Well 3	0,725 33	0,72612		0,725725		
VEGF - GrB	216 Std	0,004	4	Well 1	0,364 8	1,0673		0,71605	0,002983 54	0,061483 13
VEGF - GrB	216 Std	0,004	4	Well 2	0,970 46	1,2739		1,12218	0,004675 75	0,091835 81
VEGF - GrB	216 Std	0,004	4	Well 3	1,343 4	1,4623		1,40285	0,005845 21	0,090742 85
VEGF - GrB	216 Std	0,025	25	Well 1	2,498 6	2,4481		2,47335	0,001648 9	0,034528 37
VEGF - GrB	216 Std	0,025	25	Well 2	2,821 9	2,6845		2,7532	0,001835 47	0,031801 89
VEGF - GrB	216 Std	0,025	25	Well 3	2,617 8	2,4036		2,5107	0,001673 8	0,033791 44
VEGF - GrB	216 Std	0,1	100	Well 1	126,4 9	117,99		122,24	0,020373 33	0,249377
VEGF - GrB	216 Std	0,1	100	Well 2	94,44 9	87,008		90,7285	0,015121 42	0,221199 42
VEGF - GrB	216 Std	0,1	100	Well 3	119,2 9	127,95		123,62	0,020603 33	0,250753 08
VEGF - GrB	216 Std	0,4	400	Well 1	111,9 6	110,88		111,42	0,004642 5	0,213049 17
VEGF - GrB	216 Std	0,4	400	Well 2	79,06 1	78,021		78,541	0,003272 54	0,210805 04
VEGF - GrB	216 Std	0,4	400	Well 3	108,8 8	112,43		110,655	0,004610 63	0,185367 29
VEGF - GrB	216 Std	0	0	Well 1	0,197 93	0,20379		0,20086		
VEGF - GrB	216 Std	0	0	Well 2	0,132 92	0,16439		0,148655		
VEGF - GrB	216 Std	0	0	Well 3	0,246 83	0,25046		0,248645		
VEGF - GrB	288 Std	0,004	4	Well 1	0,954 84	0,91292		0,93388	0,003891 17	0,065374 3
VEGF - GrB	288 Std	0,004	4	Well 2	0,772 2	0,76812		0,77016	0,003209	0,095044 81
VEGF - GrB	288 Std	0,004	4	Well 3	0,959 6	0,9579		0,95875	0,003994 79	0,094737 65
VEGF - GrB	288 Std	0,025	25	Well 1	3,988 9	4,0055		3,9972	0,002664 8	0,037193 17
VEGF - GrB	288 Std	0,025	25	Well 2	5,559 2	5,6146		5,5869	0,003724 6	0,035526 49
VEGF - GrB	288 Std	0,025	25	Well 3	5,47	5,9845		5,72725	0,003818 17	0,037609 6
VEGF - GrB	288 Std	0,1	100	Well 1	376,7 7	373,75		375,26	0,062543 33	0,311920 33
VEGF - GrB	288 Std	0,1	100	Well 2	388,0 2	389,36		388,69	0,064781 67	0,285981 08
VEGF - GrB	288 Std	0,1	100	Well 3	473,4 2	465,26		469,34	0,078223 33	0,328976 42
VEGF - GrB	288 Std	0,4	400	Well 1	158,2 2	164,39		161,305	0,006721 04	0,219770 21
VEGF - GrB	288 Std	0,4	400	Well 2	197,1 6	192,41		194,785	0,008116 04	0,218921 08
VEGF - GrB	288 Std	0,4	400	Well 3	204,0 3	202,57		203,3	0,008470 83	0,193838 13
VEGF - GrB	288 Std	0	0	Well 1	0,195 2	0,2032		0,1992		
VEGF - GrB	288 Std	0	0	Well 2	0,236 15	0,20613		0,22114		
VEGF - GrB	288 Std	0	0	Well 3	0,264 21	0,26229		0,26325		
VEGF - GrB	360 Std	0,004	4	Well 1	0,439 94	0,42235		0,431145	0,001796 44	0,067170 73
VEGF - GrB	360 Std	0,004	4	Well 2	0,144 96	0,15662		0,15079	0,000628 29	0,095673 1
VEGF - GrB	360 Std	0,004	4	Well 3	0,537 72	0,5668		0,55226	0,002301 08	0,097038 73
VEGF - GrB	360 Std	0,025	25	Well 1	1,299	1,441		1,37	0,000913 33	0,038106 5
VEGF - GrB	360 Std	0,025	25	Well 2	2,082	2,0569		2,06945	0,001379 63	0,036906 12

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	360 Std	0,025	25	Well 3	2,216 2	2,0338		2,125	0,001416 67	0,039026 27
VEGF - GrB	360 Std	0,1	100	Well 1	287,4 56	305,432		296,444	0,049407 33	0,361327 67
VEGF - GrB	360 Std	0,1	100	Well 2	242,1 98	271,889		257,0435	0,042840 58	0,328821 67
VEGF - GrB	360 Std	0,1	100	Well 3	198,5 62	196,43		197,496	0,032916	0,361892 42
VEGF - GrB	360 Std	0,4	400	Well 1	90,50 4	83,712		87,108	0,003629 5	0,223399 71
VEGF - GrB	360 Std	0,4	400	Well 2	89,26 9	80,47		84,8695	0,003536 23	0,222457 31
VEGF - GrB	360 Std	0,4	400	Well 3	68,46 9	83,712		76,0905	0,003170 44	0,197008 56
VEGF - GrB	360 Std	0	0	Well 1	0,184 16	0,1954		0,18978		
VEGF - GrB	360 Std	0	0	Well 2	0,104 28	0,16559		0,134935		
VEGF - GrB	360 Std	0	0	Well 3	0,124 42	0,1223		0,12336		
VEGF - GrB	432 Std	0,004	4	Well 1	0,886 25	1,1384		1,012325	0,004218 02	0,071388 75
VEGF - GrB	432 Std	0,004	4	Well 2	1,360 4	1,7302		1,5453	0,006438 75	0,102111 85
VEGF - GrB	432 Std	0,004	4	Well 3	1,019 5	0,69966		0,85958	0,003581 58	0,100620 31
VEGF - GrB	432 Std	0,025	25	Well 1	4,988 4	4,8191		4,90375	0,003269 17	0,041375 67
VEGF - GrB	432 Std	0,025	25	Well 2	3,307 6	3,353		3,3303	0,002220 2	0,039126 32
VEGF - GrB	432 Std	0,025	25	Well 3	3,725 8	3,6961		3,71095	0,002473 97	0,041500 24
VEGF - GrB	432 Std	0,1	100	Well 1	105,3 4	108,07		106,705	0,017784 17	0,379111 83
VEGF - GrB	432 Std	0,1	100	Well 2	106,8 9	105,92		106,405	0,017734 17	0,346555 83
VEGF - GrB	432 Std	0,1	100	Well 3	4,814 3	6,2772		5,54575	0,000924 29	0,362816 71
VEGF - GrB	432 Std	0,4	400	Well 1	62,53 2	57,421		59,9765	0,002499 02	0,225898 73
VEGF - GrB	432 Std	0,4	400	Well 2	69,84 6	71,525		70,6855	0,002945 23	0,225402 54
VEGF - GrB	432 Std	0,4	400	Well 3	100,0 4	72,244		86,142	0,003589 25	0,200597 81
VEGF - GrB	432 Std	0	0	Well 1	0,116 68	0,2271		0,17189		
VEGF - GrB	432 Std	0	0	Well 2	0,095 972	0,087173		0,091572 5		
VEGF - GrB	432 Std	0	0	Well 3	0,125 4	0,1309		0,12815		
VEGF - GrB	504 Std	0,004	4	Well 1	0,221 4	0,21411		0,217755	0,000907 31	0,072296 07
VEGF - GrB	504 Std	0,004	4	Well 2	0,218 08	0,11908		0,16858	0,000702 42	0,102814 27
VEGF - GrB	504 Std	0,004	4	Well 3	0,221 4	0,18403		0,202715	0,000844 65	0,101464 96
VEGF - GrB	504 Std	0,025	25	Well 1	1,432 9	0,98175		1,207325	0,000804 88	0,042180 55
VEGF - GrB	504 Std	0,025	25	Well 2	2,843 5	2,2306		2,53705	0,001691 37	0,040817 69
VEGF - GrB	504 Std	0,025	25	Well 3	2,310 6	1,9464		2,1285	0,001419	0,042919 24
VEGF - GrB	504 Std	0,1	100	Well 1	17,2	15,306		16,253	0,002708 83	0,381820 67
VEGF - GrB	504 Std	0,1	100	Well 2	36,60 1	34,602		35,6015	0,005933 58	0,352489 42
VEGF - GrB	504 Std	0,1	100	Well 3	25,47 8	22,731		24,1045	0,004017 42	0,366834 13
VEGF - GrB	504 Std	0,4	400	Well 1	23,12 4	24,121		23,6225	0,000984 27	0,226883
VEGF - GrB	504 Std	0,4	400	Well 2	20,89 6	20,688		20,792	0,000866 33	0,226268 88

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrB	504 Std	0,4	400	Well 3	20,82 6	27,671		24,2485	0,001010 35	0,201608 17
VEGF - GrB	504 Std	0	0	Well 1	0,074 887	0,070952		0,072919 5		
VEGF - GrB	504 Std	0	0	Well 2	0,113 12	0,11067		0,111895		
VEGF - GrB	504 Std	0	0	Well 3	0,081 123	0,17113		0,126126 5		
VEGF - GrB	576 Std	0,004	4	Well 1	0,320 27	0,29067		0,30547	0,001272 79	0,073568 86
VEGF - GrB	576 Std	0,004	4	Well 2	0,302 19	0,37842		0,340305	0,001417 94	0,104232 21
VEGF - GrB	576 Std	0,004	4	Well 3	0,290 42	0,34488		0,31765	0,001323 54	0,102788 5
VEGF - GrB	576 Std	0,025	25	Well 1	2,09	2,408		2,249	0,001499 33	0,043679 88
VEGF - GrB	576 Std	0,025	25	Well 2	1,860 1	1,7065		1,7833	0,001188 87	0,042006 55
VEGF - GrB	576 Std	0,025	25	Well 3	1,661 8	1,7244		1,6931	0,001128 73	0,044047 97
VEGF - GrB	576 Std	0,1	100	Well 1	26,91 1	23,53		25,2205	0,004203 42	0,386024 08
VEGF - GrB	576 Std	0,1	100	Well 2	23,68	23,473		23,5765	0,003929 42	0,356418 83
VEGF - GrB	576 Std	0,1	100	Well 3	33,59 2	51,035		42,3135	0,007052 25	0,373886 38
VEGF - GrB	576 Std	0,4	400	Well 1	12,95 1	18,356		15,6535	0,000652 23	0,227535 23
VEGF - GrB	576 Std	0,4	400	Well 2	22,03	20,956		21,493	0,000895 54	0,227164 42
VEGF - GrB	576 Std	0,4	400	Well 3	17,55 7	16,282		16,9195	0,000704 98	0,202313 15
VEGF - GrB	576 Std	0	0	Well 1	0,050 295	0,10635		0,078322 5		
VEGF - GrB	576 Std	0	0	Well 2	0,057 613	0,037753		0,047683		
VEGF - GrB	576 Std	0	0	Well 3	0,052 514	0,057389		0,054951 5		
VEGF - GrB	648 Std	0,004	4	Well 1	0,321 17	0,34577		0,33347	0,001389 46	0,074958 32
VEGF - GrB	648 Std	0,004	4	Well 2	0,161 8	0,32609		0,243945	0,001016 44	0,105248 65
VEGF - GrB	648 Std	0,004	4	Well 3	0,558 24	0,73908		0,64866	0,002702 75	0,105491 25
VEGF - GrB	648 Std	0,025	25	Well 1	1,720 6	1,8004		1,7605	0,001173 67	0,044853 55
VEGF - GrB	648 Std	0,025	25	Well 2	2,370 7	2,3327		2,3517	0,001567 8	0,043574 35
VEGF - GrB	648 Std	0,025	25	Well 3	1,963 7	1,7937		1,8787	0,001252 47	0,045300 44
VEGF - GrB	648 Std	0,1	100	Well 1	24,60 1	29,71		27,1555	0,004525 92	0,39055
VEGF - GrB	648 Std	0,1	100	Well 2	20,63 7	19,379		20,008	0,003334 67	0,359753 5
VEGF - GrB	648 Std	0,1	100	Well 3	20,88 1	19,341		20,111	0,003351 83	0,377238 21
VEGF - GrB	648 Std	0,4	400	Well 1	20,33 4	25,034		22,684	0,000945 17	0,228480 4
VEGF - GrB	648 Std	0,4	400	Well 2	17,75 8	17,781		17,7695	0,000740 4	0,227904 81
VEGF - GrB	648 Std	0,4	400	Well 3	48,00 8	26,746		37,377	0,001557 38	0,203870 52
VEGF - GrB	648 Std	0	0	Well 1	0,058 463	0,055824		0,057143 5		
VEGF - GrB	648 Std	0	0	Well 2	0,036 724	0,036903		0,036813 5		
VEGF - GrB	648 Std	0	0	Well 3	0,070 677	0,055421		0,063049		
VEGF - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 1	8,968 2	10,563		9,7656	0,006510 4	0,006510 4
VEGF - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 2	58,81	55,415		57,1125	0,038075	0,038075

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrC	001 Std	400,025	025/400	Well 3	94,45 4	99,785		97,1195	0,064746 33	0,064746 33
VEGF - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 1	14,62 2	14,213		14,4175	0,009611 67	0,009611 67
VEGF - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 2	27,95 2	26,906		27,429	0,018286	0,018286
VEGF - GrC	001 Std	800,025	025/800	Well 3	15,57	34,4		24,985	0,016656 67	0,016656 67
VEGF - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 1	94,89 2	89,33		92,111	0,015351 83	0,015351 83
VEGF - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 2	113,0 8	124,88		118,98	0,01983	0,01983
VEGF - GrC	001 Std	400,1	100/400	Well 3	182,2 7	179,54		180,905	0,030150 83	0,030150 83
VEGF - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 1	11,21	12,033		11,6215	0,001936 92	0,001936 92
VEGF - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 2	66,66	65,17		65,915	0,010985 83	0,010985 83
VEGF - GrC	001 Std	800,1	100/800	Well 3	34,63 7	58,779		46,708	0,007784 67	0,007784 67
VEGF - GrC	001 Std	0	0/0	Well 1	0,295 77	0,29381		0,29479		
VEGF - GrC	001 Std	0	0/0	Well 2	0,345 24	0,33411		0,339675		
VEGF - GrC	001 Std	0	0/0	Well 3	0,320 39	0,31926		0,319825		
VEGF - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 1	12,94 2	14,238		13,59	0,00906	0,015570 4
VEGF - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 2	54,82 6	55,911		55,3685	0,036912 33	0,074987 33
VEGF - GrC	012 Std	400,025	025/400	Well 3	91,40 7	90,646		91,0265	0,060684 33	0,125430 67
VEGF - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 1	15,57	34,4		24,985	0,016656 67	0,026268 33
VEGF - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 2	58,10 3	51,29		54,6965	0,036464 33	0,054750 33
VEGF - GrC	012 Std	800,025	025/800	Well 3	78,06 7	74,651		76,359	0,050906	0,067562 67
VEGF - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 1	183,0 9	173,8		178,445	0,029740 83	0,045092 67
VEGF - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 2	113,0 8	124,88		118,98	0,01983	0,03966
VEGF - GrC	012 Std	400,1	100/400	Well 3	142,4 4	135,08		138,76	0,023126 67	0,053277 5
VEGF - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 1	34,63 7	32,579		33,608	0,005601 33	0,007538 25
VEGF - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 2	164,8 6	162,45		163,655	0,027275 83	0,038261 67
VEGF - GrC	012 Std	800,1	100/800	Well 3	313,6 5	218,63		266,14	0,044356 67	0,052141 33
VEGF - GrC	012 Std	0	0/0	Well 1	0,172 06	0,1797		0,17588		
VEGF - GrC	012 Std	0	0/0	Well 2	0,034 516	0,03804		0,036278		
VEGF - GrC	012 Std	0	0/0	Well 3	0,366	0,37246		0,36923		
VEGF - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 1	10,54	10,654		10,597	0,007064 67	0,022635 07
VEGF - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 2	105,6 5	98,733		102,1915	0,068127 67	0,143115
VEGF - GrC	024 Std	400,025	025/400	Well 3	265,6 2	254,28		259,95	0,1733	0,298730 67
VEGF - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 1	23,64 9	22,302		22,9755	0,015317	0,041585 33
VEGF - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 2	43,28	51,548		47,414	0,031609 33	0,086359 67
VEGF - GrC	024 Std	800,025	025/800	Well 3	251,6 4	257,56		254,6	0,169733 33	0,237296
VEGF - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 1	222,6 1	195,28		208,945	0,034824 17	0,079916 83
VEGF - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 2	78,71 9	77,828		78,2735	0,013045 58	0,052705 58

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrC	024 Std	400,1	100/400	Well 3	170,4 6	193,5		181,98	0,03033	0,083607 5
VEGF - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 1	18,56 8	20,063		19,3155	0,003219 25	0,010757 5
VEGF - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 2	113,3 2	97,032		105,176	0,017529 33	0,055791
VEGF - GrC	024 Std	800,1	100/800	Well 3	195,5	263,67		229,585	0,038264 17	0,090405 5
VEGF - GrC	024 Std	0	0/0	Well 1	0,052 78	0,068459		0,060619 5		
VEGF - GrC	024 Std	0	0/0	Well 2	0,074 627	0,10793		0,091278 5		
VEGF - GrC	024 Std	0	0/0	Well 3	0,267 05	0,11163		0,18934		
VEGF - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 1	36,24	40,173		38,2065	0,025471	0,048106 07
VEGF - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 2	196,3	185,54		190,92	0,12728	0,270395
VEGF - GrC	072 Std	400,025	025/400	Well 3	204,1 1	201,6		202,855	0,135236 67	0,433967 33
VEGF - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 1	50,45 4	52,711		51,5825	0,034388 33	0,075973 67
VEGF - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 2	62,09 8	64,014		63,056	0,042037 33	0,128397
VEGF - GrC	072 Std	800,025	025/800	Well 3	237,1 8	264,65		250,915	0,167276 67	0,404572 67
VEGF - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 1	423,7 5	388,54		406,145	0,067690 83	0,147607 67
VEGF - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 2	257,3 1	251,58		254,445	0,042407 5	0,095113 08
VEGF - GrC	072 Std	400,1	100/400	Well 3	346,0 3	338,05		342,04	0,057006 67	0,140614 17
VEGF - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 1	49,25	50,6		49,925	0,008320 83	0,019078 33
VEGF - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 2	204,7 6	210,4		207,58	0,034596 67	0,090387 67
VEGF - GrC	072 Std	800,1	100/800	Well 3	262,1 8	247,77		254,975	0,042495 83	0,132901 33
VEGF - GrC	072 Std	0	0/0	Well 1	0,262 03	0,31926		0,290645		
VEGF - GrC	072 Std	0	0/0	Well 2	0,201 32	0,2245		0,21291		
VEGF - GrC	072 Std	0	0/0	Well 3	0,395 35	0,37076		0,383055		
VEGF - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 1	37,60 5	42,227		39,916	0,026610 67	0,074716 73
VEGF - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 2	129,5 3	133,27		131,4	0,0876	0,357995
VEGF - GrC	144 Std	400,025	025/400	Well 3	227,5 7	218,61		223,09	0,148726 67	0,582694
VEGF - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 1	56,04 2	59,38		57,711	0,038474	0,114447 67
VEGF - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 2	92,14 3	95,519		93,831	0,062554	0,190951
VEGF - GrC	144 Std	800,025	025/800	Well 3	148,0 6	147,45		147,755	0,098503 33	0,503076
VEGF - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 1	297,4	293,27		295,335	0,049222 5	0,196830 17
VEGF - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 2	213,7 7	202,95		208,36	0,034726 67	0,129839 75
VEGF - GrC	144 Std	400,1	100/400	Well 3	293,0 1	286,28		289,645	0,048274 17	0,188888 33
VEGF - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 1	47,08	50,08		48,58	0,008096 67	0,027175
VEGF - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 2	148,8 7	115,16		132,015	0,022002 5	0,112390 17
VEGF - GrC	144 Std	800,1	100/800	Well 3	106,0 8	86,606		96,343	0,016057 17	0,148958 5
VEGF - GrC	144 Std	0	0/0	Well 1	0,403 97	0,18441		0,29419		
VEGF - GrC	144 Std	0	0/0	Well 2	0,317 63	0,54089		0,42926		

Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrC	144 Std	0	0/0	Well 3	0,321 4	0,42371		0,372555		
VEGF - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 1	14,84 2	15,25		15,046	0,010030 67	0,084747 4
VEGF - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 2	44,44 4	43,45		43,947	0,029298	0,387293
VEGF - GrC	216 Std	400,025	025/400	Well 3	60,41 3	64,321		62,367	0,041578	0,624272
VEGF - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 1	28,39 7	30,925		29,661	0,019774	0,134221 67
VEGF - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 2	38,65	40,046		39,348	0,026232	0,217183
VEGF - GrC	216 Std	800,025	025/800	Well 3	55,55 1	52,054		53,8025	0,035868 33	0,538944 33
VEGF - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 1	121,5 9	116,85		119,22	0,01987	0,216700 17
VEGF - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 2	78,22 1	74,67		76,4455	0,012740 92	0,142580 67
VEGF - GrC	216 Std	400,1	100/400	Well 3	64,95	65,639		65,2945	0,010882 42	0,199770 75
VEGF - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 1	26,00 7	25,335		25,671	0,004278 5	0,031453 5
VEGF - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 2	100,1 4	92,221		96,1805	0,016030 08	0,128420 25
VEGF - GrC	216 Std	800,1	100/800	Well 3	45,72	48,299		47,0095	0,007834 92	0,156793 42
VEGF - GrC	216 Std	0	0/0	Well 1	0,168 96	0,10814		0,13855		
VEGF - GrC	216 Std	0	0/0	Well 2	0,032 065	0,0416		0,036832 5		
VEGF - GrC	216 Std	0	0/0	Well 3	0,226 98	0,23059		0,228785		
VEGF - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 1	21,07 3	24,6		22,8365	0,015224 33	0,099971 73
VEGF - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 2	50,91	52,959		51,9345	0,034623	0,421916
VEGF - GrC	288 Std	400,025	025/400	Well 3	40,40 3	38,989		39,696	0,026464	0,650736
VEGF - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 1	39,43 2	38,458		38,945	0,025963 33	0,160185
VEGF - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 2	44,80 2	47,086		45,944	0,030629 33	0,247812 33
VEGF - GrC	288 Std	800,025	025/800	Well 3	49,89 4	48,935		49,4145	0,032943	0,571887 33
VEGF - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 1	70,97	69,733		70,3515	0,011725 25	0,228425 42
VEGF - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 2	72,35 7	72,095		72,226	0,012037 67	0,154618 33
VEGF - GrC	288 Std	400,1	100/400	Well 3	84,74 8	84,439		84,5935	0,014098 92	0,213869 67
VEGF - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 1	23,85 4	21,761		22,8075	0,003801 25	0,035254 75
VEGF - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 2	41,32 8	48,69		45,009	0,007501 5	0,135921 75
VEGF - GrC	288 Std	800,1	100/800	Well 3	28,87 3	26,132		27,5025	0,004583 75	0,161377 17
VEGF - GrC	288 Std	0	0/0	Well 1	0,131 64	0,12556		0,1286		
VEGF - GrC	288 Std	0	0/0	Well 2	0,104 67	0,11454		0,109605		
VEGF - GrC	288 Std	0	0/0	Well 3	0,207 62	0,20211		0,204865		
VEGF - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 1	2,182	8,3094		5,2457	0,003497 13	0,103468 87
VEGF - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 2	12,97 2	14,932		13,952	0,009301 33	0,431217 33
VEGF - GrC	360 Std	400,025	025/400	Well 3	13,92 9	15,087		14,508	0,009672	0,660408
VEGF - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 1	11,79 8	11,906		11,852	0,007901 33	0,168086 33
VEGF - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 2	15,83 1	15,999		15,915	0,01061	0,258422 33

Ver- such	Zeit- punk t	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrC	360 Std	800,025	025/800	Well 3	9,019 6	11,057		10,0383	0,006692 2	0,578579 53
VEGF - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 1	12,23 1	12,586		12,4085	0,002068 08	0,230493 5
VEGF - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 2	17,68 6	17,397		17,5415	0,002923 58	0,157541 92
VEGF - GrC	360 Std	400,1	100/400	Well 3	15,42 6	16,216		15,821	0,002636 83	0,216506 5
VEGF - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 1	20,57 1	21,621		21,096	0,003516	0,038770 75
VEGF - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 2	44,86 4	44,093		44,4785	0,007413 08	0,143334 83
VEGF - GrC	360 Std	800,1	100/800	Well 3	5,394 1	5,467		5,43055	0,000905 09	0,162282 26
VEGF - GrC	360 Std	0	0/0	Well 1	0,250 16	0,031818		0,140989		
VEGF - GrC	360 Std	0	0/0	Well 2	0,050 1	0,0351		0,0426		
VEGF - GrC	360 Std	0	0/0	Well 3	0,128 3	0,073731		0,101015 5		
VEGF - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 1	21,98 9	18,314		20,1515	0,013434 33	0,116903 2
VEGF - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 2	32,48 2	28,452		30,467	0,020311 33	0,451528 67
VEGF - GrC	432 Std	400,025	025/400	Well 3	14,28 6	14,508		14,397	0,009598	0,670006
VEGF - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 1	16,41 4	16,435		16,4245	0,010949 67	0,179036
VEGF - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 2	14,46 1	16,641		15,551	0,010367 33	0,268789 67
VEGF - GrC	432 Std	800,025	025/800	Well 3	12,14 5	12,78		12,4625	0,008308 33	0,586887 87
VEGF - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 1	13,76 3	14,076		13,9195	0,002319 92	0,232813 42
VEGF - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 2	15,39 5	16,083		15,739	0,002623 17	0,160165 08
VEGF - GrC	432 Std	400,1	100/400	Well 3	13,43 8	13,757		13,5975	0,002266 25	0,218772 75
VEGF - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 1	22,40 2	20,089		21,2455	0,003540 92	0,042311 67
VEGF - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 2	40,90 8	39,307		40,1075	0,006684 58	0,150019 42
VEGF - GrC	432 Std	800,1	100/800	Well 3	46,66	47,859		47,2595	0,007876 58	0,170158 84
VEGF - GrC	432 Std	0	0/0	Well 1	0,013 55	0,024514		0,019032		
VEGF - GrC	432 Std	0	0/0	Well 2	0,012 3	0,0078		0,01005		
VEGF - GrC	432 Std	0	0/0	Well 3	0,099 404	0,066141		0,082772 5		
VEGF - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 1	5,509 7	5,1269		5,3183	0,003545 53	0,120448 73
VEGF - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 2	13,71 2	15,235		14,4735	0,009649	0,461177 67
VEGF - GrC	504 Std	400,025	025/400	Well 3	10,06 2	10,043		10,0525	0,006701 67	0,676707 67
VEGF - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 1	9,841 1	10,078		9,95955	0,006639 7	0,185675 7
VEGF - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 2	12,05 5	12,1		12,0775	0,008051 67	0,276841 33
VEGF - GrC	504 Std	800,025	025/800	Well 3	7,893 1	7,9302		7,91165	0,005274 43	0,592162 3
VEGF - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 1	5,219 5	5,1353		5,1774	0,000862 9	0,233676 32
VEGF - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 2	18,75 9	19,171		18,965	0,003160 83	0,163325 92
VEGF - GrC	504 Std	400,1	100/400	Well 3	10,19 7	10,478		10,3375	0,001722 92	0,220495 67
VEGF - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 1	10,76 1	11,147		10,954	0,001825 67	0,044137 33
VEGF - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 2	17,08 6	18,561		17,8235	0,002970 58	0,15299



Ver- such	Zeit- punkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert3	mean	Relativ/ Gesamt	kumuliert
VEGF - GrC	504 Std	800,1	100/800	Well 3	6,522 9	6,597		6,55995	0,001093 33	0,171252 17
VEGF - GrC	504 Std	0	0/0	Well 1	0,008 7	0,0062		0,00745		
VEGF - GrC	504 Std	0	0/0	Well 2	0,000 1	0,000234 59		0,000167 3		
VEGF - GrC	504 Std	0	0/0	Well 3	0,025 218	0,032221		0,028719 5		
VEGF - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 1	10,79 6	10,893		10,8445	0,007229 67	0,127678 4
VEGF - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 2	7,382 7	7,6236		7,50315	0,005002 1	0,466179 77
VEGF - GrC	576 Std	400,025	025/400	Well 3	3,397 9	3,3794		3,38865	0,002259 1	0,678966 77
VEGF - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 1	11,44 3	11,722		11,5825	0,007721 67	0,193397 37
VEGF - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 2	9,676 3	13,298		11,48715	0,007658 1	0,284499 43
VEGF - GrC	576 Std	800,025	025/800	Well 3	6,158 1	6,115		6,13655	0,004091 03	0,596253 33
VEGF - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 1	10,19 7	10,478		10,3375	0,001722 92	0,235399 23
VEGF - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 2	11,05 6	10,915		10,9855	0,001830 92	0,165156 83
VEGF - GrC	576 Std	400,1	100/400	Well 3	10,87 8	11,122		11	0,001833 33	0,222329
VEGF - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 1	11,69 3	11,759		11,726	0,001954 33	0,046091 67
VEGF - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 2	18,35	17,796		18,073	0,003012 17	0,156002 17
VEGF - GrC	576 Std	800,1	100/800	Well 3	4,654	4,3859		4,51995	0,000753 33	0,172005 49
VEGF - GrC	576 Std	0	0/0	Well 1	0,010 12	0,00981		0,009965		
VEGF - GrC	576 Std	0	0/0	Well 2	0,032 298	0,031592		0,031945		
VEGF - GrC	576 Std	0	0/0	Well 3	0,034 72	0,035029		0,034874 5		
VEGF - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 1	6,193 4	5,4877		5,84055	0,003893 7	0,131572 1
VEGF - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 2	5,417 2	5,0644		5,2408	0,003493 87	0,469673 63
VEGF - GrC	648 Std	400,025	025/400	Well 3	3,378 7	5,08		4,22935	0,002819 57	0,681786 33
VEGF - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 1	5,133 4	5,1454		5,1394	0,003426 27	0,196823 63
VEGF - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 2	5,900 5	5,6727		5,7866	0,003857 73	0,288357 17
VEGF - GrC	648 Std	800,025	025/800	Well 3	6,848 8	10,063		8,4559	0,005637 27	0,601890 6
VEGF - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 1	3,613 9	3,167		3,39045	0,000565 08	0,235964 31
VEGF - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 2	10,39 7	10,534		10,4655	0,001744 25	0,166901 08
VEGF - GrC	648 Std	400,1	100/400	Well 3	7,692 1	7,4875		7,5898	0,001264 97	0,223593 97
VEGF - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 1	4,358 8	4,4293		4,39405	0,000732 34	0,046824 01
VEGF - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 2	7,345 1	6,9377		7,1414	0,001190 23	0,157192 4
VEGF - GrC	648 Std	800,1	100/800	Well 3	4,131 4	4,0059		4,06865	0,000678 11	0,172683 6
VEGF - GrC	648 Std	0	0/0	Well 1	0,012 432	0,01896		0,015696		
VEGF - GrC	648 Std	0	0/0	Well 2	0,033 823	0,024836		0,029329 5		
VEGF - GrC	648 Std	0	0/0	Well 3	0,042 255	0,04249		0,042372 5		

Tabelle: AP Versuch.

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	mean
AP BMP	001Std	200	200	Well 1	2,78213698	1,51681905	1,70890493	2,00262032
AP BMP	001Std	400	400	Well 1	7,31272215	4,49746719	4,11329444	5,30782793
AP BMP	001Std	800	800	Well 1	7,73001289	5,89837182	6,19974814	6,60937762
AP BMP	001Std	1600	1600	Well 1	13,4528573	10,48857	10,7700753	11,5705009
AP BMP	001Std	0	0	Well 1	0	0	0	0
AP BMP	012Std	200	200	Well 1	5,76278512	3,6926922	3,49729382	4,31759038
AP BMP	012Std	400	400	Well 1	5,10704253	3,24559497	3,00051913	3,78438554
AP BMP	012Std	800	800	Well 1	15,4796981	10,2799246	9,97523578	11,9116195
AP BMP	012Std	1600	1600	Well 1	20,8448647	14,7807033	14,5654339	16,730334
AP BMP	012Std	0	0	Well 1	7,96846474	4,76572553	4,05368147	5,59595725
AP BMP	072Std	200	200	Well 1	11,1875647	6,43488849	5,50426357	7,7089056
AP BMP	072Std	400	400	Well 1	15,2412462	9,95205329	9,12078331	11,4380276
AP BMP	072Std	800	800	Well 1	51,3667017	36,1519505	34,8139703	40,7775408
AP BMP	072Std	1600	1600	Well 1	95,9571979	70,4890171	68,972198	78,4728043
AP BMP	072Std	0	0	Well 1	8,80304622	4,70611256	4,21264937	5,90726939
AP BMP	144Std	200	200	Well 1	1,35142587	1,81488387	2,0864537	1,75092114
AP BMP	144Std	400	400	Well 1	6,65697956	6,04740423	7,53110431	6,7451627
AP BMP	144Std	800	800	Well 1	34,9731369	29,5647181	35,310745	33,2828667
AP BMP	144Std	1600	1600	Well 1	70,5620757	58,0001013	69,1510369	65,9044047
AP BMP	144Std	0	0	Well 1	0	0,77165702	1,13264629	0,63476777
AP BMP	288Std	200	200	Well 1	0,75529624	0,86107646	0,55638765	0,72425345
AP BMP	288Std	400	400	Well 1	0,45723142	1,12933479	1,31148518	0,96601713
AP BMP	288Std	800	800	Well 1	31,0386814	25,1533588	29,6872555	28,6264319
AP BMP	288Std	1600	1600	Well 1	49,4590869	39,9969866	47,4320474	45,6293736
AP BMP	288Std	0	0	Well 1	0,21877957	0,62262461	0,89419444	0,57853288
AP BMP	360Std	200	200	Well 1	0	0,17552739	0,45703272	0,21085337
AP BMP	360Std	400	400	Well 1	0	0,29475331	0,51664568	0,27046633
AP BMP	360Std	800	800	Well 1	11,4856296	10,1606987	11,9027216	11,1830166
AP BMP	360Std	1600	1600	Well 1	36,8211388	30,5781384	35,7677777	34,3890183
AP BMP	360Std	0	0	Well 1	0	0	0	0
AP BMP	432Std	200	200	Well 1	6,83581845	3,51385331	3,00051913	4,45006363
AP BMP	432Std	400	400	Well 1	2,06678142	2,14275516	2,06658271	2,09203977
AP BMP	432Std	800	800	Well 1	24,5408684	23,4841959	22,1362802	23,3871148
AP BMP	432Std	1600	1600	Well 1	70,7409146	69,6246291	66,3889696	68,9181711
AP BMP	432Std	0	0	Well 1	1,35142587	1,90430331	1,96722777	1,74098565
AP BMP	504Std	200	200	Well 1	5,22626845	5,18301627	4,0139395	4,80774141
AP BMP	504Std	400	400	Well 1	2,9013629	2,47062646	2,52361543	2,63186826
AP BMP	504Std	800	800	Well 1	10,6510481	9,50495607	8,78297652	9,64632689
AP BMP	504Std	1600	1600	Well 1	33,0059091	32,038656	30,462224	31,8355964
AP BMP	504Std	0	0	Well 1	2,12639438	2,20236812	2,06658271	2,13178174
AP BMP	576Std	200	200	Well 1	4,63013882	3,27540146	2,50374444	3,46976157
AP BMP	576Std	400	400	Well 1	3,02058883	2,35140053	2,18580864	2,519266

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	mean
AP BMP	576Std	800	800	Well 1	10,0549184	9,50495607	9,22013825	9,59333759
AP BMP	576Std	1600	1600	Well 1	17,6853777	16,6287051	15,2807895	16,5316241
AP BMP	576Std	0	0	Well 1	16,7315703	3,66288571	2,62297036	7,67247545
AP BMP	648Std	200	200	Well 1	2,18600735	2,5600459	1,96722777	2,23776034
AP BMP	648Std	400	400	Well 1	3,31865364	2,91772368	2,64284135	2,95973956
AP BMP	648Std	800	800	Well 1	10,5318221	10,1606987	9,51820307	10,0702413
AP BMP	648Std	1600	1600	Well 1	13,3932444	13,3201857	12,777045	13,1634917
AP BMP	648Std	0	0	Well 1	6,53775363	2,73888479	2,46400246	3,91354696
AP Kombi	001Std	400,025	025/400	Well 1	4,34512329	4,04706443	3,32287026	3,90501933
AP Kombi	001Std	400,1	100/400	Well 1	7,56422328	7,38539035	6,54197026	7,1638613
AP Kombi	001Std	800,025	025/800	Well 1	21,0367529	20,6790811	18,6235307	20,1131216
AP Kombi	001Std	800,1	100/800	Well 1	82,3188787	80,8881735	72,3745522	78,5272015
AP Kombi	001Std	0	0/0	Well 1	4,10667144	3,33170888	2,48828879	3,3088897
AP Kombi	012Std	400,025	025/400	Well 1	9,71028994	9,29300516	8,29061717	9,09797076
AP Kombi	012Std	400,1	100/400	Well 1	10,4852585	10,4852644	9,3636505	10,1113911
AP Kombi	012Std	800,025	025/800	Well 1	27,9518566	26,4019255	23,3925678	25,9154499
AP Kombi	012Std	800,1	100/800	Well 1	64,0773121	62,527381	56,5572461	61,0539797
AP Kombi	012Std	0	0/0	Well 1	4,34512329	3,42112832	2,50815977	3,42480379
AP Kombi	072Std	400,025	025/400	Well 1	34,8073473	35,4034829	31,2018659	33,804232
AP Kombi	072Std	400,1	100/400	Well 1	29,0248899	28,786444	25,7572153	27,8561831
AP Kombi	072Std	800,025	025/800	Well 1	70,2770602	70,4857115	62,8166072	67,859793
AP Kombi	072Std	800,1	100/800	Well 1	56,0295621	56,029568	49,8607233	53,9732845
AP Kombi	072Std	0	0/0	Well 1	6,2527381	4,70280703	3,70041903	4,88532138
AP Kombi	144Std	400,025	025/400	Well 1	64,3753769	54,5988569	52,9009844	57,2917394
AP Kombi	144Std	400,1	100/400	Well 1	41,0070954	33,7939329	33,3081906	36,0364063
AP Kombi	144Std	800,025	025/800	Well 1	86,1937213	72,065455	73,5270695	77,2620819
AP Kombi	144Std	800,1	100/800	Well 1	101,514253	85,687017	83,99908	90,4001166
AP Kombi	144Std	0	0/0	Well 1	3,15286403	2,0202237	2,60751471	2,59353415
AP Kombi	288Std	400,025	025/400	Well 1	40,172514	33,1978033	32,0960603	35,1554592
AP Kombi	288Std	400,1	100/400	Well 1	41,3647732	34,479482	33,1094807	36,317912
AP Kombi	288Std	800,025	025/800	Well 1	49,650975	41,3945857	39,7463906	43,5973171
AP Kombi	288Std	800,1	100/800	Well 1	71,9462231	60,5303467	58,1469251	63,541165
AP Kombi	288Std	0	0/0	Well 1	6,13351217	3,80861258	3,54145113	4,49452529
AP Kombi	360Std	400,025	025/400	Well 1	36,5361232	29,7700579	29,0756702	31,7939504
AP Kombi	360Std	400,1	100/400	Well 1	35,8803806	29,2931542	28,8372184	31,3369177
AP Kombi	360Std	800,025	025/800	Well 1	75,6422268	62,7360263	61,6640899	66,680781
AP Kombi	360Std	800,1	100/800	Well 1	66,3426046	54,8969217	54,8284702	58,6893322
AP Kombi	360Std	0	0/0	Well 1	5,41815662	3,92783851	3,22351533	4,18983682
AP Kombi	432Std	400,025	025/400	Well 1	24,1962399	32,0353505	22,2996634	26,1770846
AP Kombi	432Std	400,1	100/400	Well 1	20,5002362	20,1127579	19,1401764	19,9177235
AP Kombi	432Std	800,025	025/800	Well 1	25,9846288	25,7461829	24,4656011	25,3988043
AP Kombi	432Std	800,1	100/800	Well 1	36,4765103	36,834194	34,8183856	36,04303
AP Kombi	432Std	0	0/0	Well 1	1,12602329	0,85777092	0,87873879	0,95417767
AP Kombi	504Std	400,025	025/400	Well 1	37,9668343	37,3110977	35,0965795	36,7915038

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	mean
AP Kombi	504Std	400,1	100/400	Well 1	18,4733955	17,519594	16,3582381	17,4504092
AP Kombi	504Std	800,025	025/800	Well 1	30,6344399	30,2469616	28,5590245	29,8134753
AP Kombi	504Std	800,1	100/800	Well 1	40,4705788	41,6330375	39,5675517	40,557056
AP Kombi	504Std	0	0/0	Well 1	2,13944366	1,30486814	1,23641657	1,56024279
AP Kombi	576Std	400,025	025/400	Well 1	23,7193362	22,3184375	21,2266301	22,421468
AP Kombi	576Std	400,1	100/400	Well 1	15,969651	14,1216552	13,1391381	14,4101481
AP Kombi	576Std	800,025	025/800	Well 1	36,3572843	35,4332894	34,1427721	35,3111153
AP Kombi	576Std	800,1	100/800	Well 1	29,8594714	27,8922496	26,0155381	27,9224197
AP Kombi	576Std	0	0/0	Well 1	3,86821958	2,40770796	1,83254619	2,70282458
AP Kombi	648Std	400,025	025/400	Well 1	32,1843769	31,4690273	29,6121869	31,0885304
AP Kombi	648Std	400,1	100/400	Well 1	14,419714	14,0620422	13,1987511	13,8935024
AP Kombi	648Std	800,025	025/800	Well 1	51,6778158	50,6942079	48,2114313	50,194485
AP Kombi	648Std	800,1	100/800	Well 1	32,5420547	32,2141894	30,3672844	31,7078428
AP Kombi	648Std	0	0/0	Well 1	1,30486218	0,94719037	0,83899681	1,03034979

Tabelle: HUVEC Zellversuche.

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	relativ
Zell VEGF	012Std	0,004	4	Well 1	230200	244700	219800	1,64179928
Zell VEGF	012Std	0,004	4	Well 2	225800	225700	248700	1,65479754
Zell VEGF	012Std	0,004	4	Well 3	216100	180000	207900	1,42744604
Zell VEGF	012Std	0,025	25	Well 1	231200	229500	233400	1,64038128
Zell VEGF	012Std	0,025	25	Well 2	240100	248100	244000	1,73042382
Zell VEGF	012Std	0,025	25	Well 3	201500	194900	206100	1,42390106
Zell VEGF	012Std	0,1	100	Well 1	208100	204900	194800	1,43642666
Zell VEGF	012Std	0,1	100	Well 2	261900	243100	249800	1,78383488
Zell VEGF	012Std	0,1	100	Well 3	222600	214000	220700	1,55341106
Zell VEGF	012Std	0,4	400	Well 1	123800	123500	110000	0,84441468
Zell VEGF	012Std	0,4	400	Well 2	139400	125700	113200	0,89404443
Zell VEGF	012Std	0,4	400	Well 3	183800	176800	176800	1,27004884
Zell VEGF	012Std	0	0	Well 1	139100	142700	130300	
Zell VEGF	012Std	0	0	Well 2	137000	130600	138100	
Zell VEGF	012Std	0	0	Well 3	143900	163900	143800	
Zell VEGF	072Std	0,004	4	Well 1	165100	145100	149700	1,33748237
Zell VEGF	072Std	0,004	4	Well 2	186300	191400	170700	1,5948583
Zell VEGF	072Std	0,004	4	Well 3	163000	152900	150900	1,35754897
Zell VEGF	072Std	0,025	25	Well 1	172200	151100	144300	1,35987553
Zell VEGF	072Std	0,025	25	Well 2	189400	204900	183600	1,68065027
Zell VEGF	072Std	0,025	25	Well 3				

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	relativ
Zell VEGF	072Std	0,1	100	Well 1	146000	132600	135700	1,20486833
Zell VEGF	072Std	0,1	100	Well 2	160100	127800	113100	1,16618924
Zell VEGF	072Std	0,1	100	Well 3	50660	62620	59260	0,50178127
Zell VEGF	072Std	0,4	400	Well 1	188600	159400	183900	1,54687296
Zell VEGF	072Std	0,4	400	Well 2	135800	135500	147900	1,21911852
Zell VEGF	072Std	0,4	400	Well 3				
Zell VEGF	072Std	0	0	Well 1	108100	112100	117600	
Zell VEGF	072Std	0	0	Well 2	131600	118700	99610	
Zell VEGF	072Std	0	0	Well 3				
Zell VEGF	216Std	0,004	4	Well 1	252100	246900	242900	1,18155757
Zell VEGF	216Std	0,004	4	Well 2	295000	295100	286900	1,39671922
Zell VEGF	216Std	0,004	4	Well 3	258500	259200	264300	1,24542125
Zell VEGF	216Std	0,025	25	Well 1	327600	337500	362800	1,63704412
Zell VEGF	216Std	0,025	25	Well 2	372800	353300	345200	1,7061634
Zell VEGF	216Std	0,025	25	Well 3	341300	347700	345300	1,64723682
Zell VEGF	216Std	0,1	100	Well 1	350000	345200	352100	1,66794075
Zell VEGF	216Std	0,1	100	Well 2	404200	401300	402300	1,92355471
Zell VEGF	216Std	0,1	100	Well 3	328700	313000	311300	1,5177576
Zell VEGF	216Std	0,4	400	Well 1	302600	326200	294300	1,47013856
Zell VEGF	216Std	0,4	400	Well 2	323400	317300	319000	1,52842809
Zell VEGF	216Std	0,4	400	Well 3	292600	295800	277500	1,37904125
Zell VEGF	216Std	0	0	Well 1	185700	171100	187000	
Zell VEGF	216Std	0	0	Well 2	231300	238400	225700	
Zell VEGF	216Std	0	0	Well 3	219600	210400	214500	
Zell VEGF	360Std	0,004	4	Well 1	178000	181000	184000	1,27215931
Zell VEGF	360Std	0,004	4	Well 2	165100	160500	168900	1,15853182
Zell VEGF	360Std	0,004	4	Well 3	152900	144700	125300	0,99078485
Zell VEGF	360Std	0,025	25	Well 1	181700	178900	183200	1,27403358
Zell VEGF	360Std	0,025	25	Well 2	208000	204500	203300	1,44271769
Zell VEGF	360Std	0,025	25	Well 3	190000	187900	191400	1,33377587
Zell VEGF	360Std	0,1	100	Well 1	237400	230700	233900	1,64467005
Zell VEGF	360Std	0,1	100	Well 2	160100	151200	149400	1,07934401
Zell VEGF	360Std	0,1	100	Well 3	232000	231600	218700	1,5985162
Zell VEGF	360Std	0,4	400	Well 1				
Zell VEGF	360Std	0,4	400	Well 2	196400	202400	208600	1,42303788
Zell VEGF	360Std	0,4	400	Well 3	181200	180700	179000	1,26723936

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	relativ
Zell VEGF	360Std	0	0	Well 1	158800	154200	158500	
Zell VEGF	360Std	0	0	Well 2	133300	167100	140300	
Zell VEGF	360Std	0	0	Well 3	120700	129600	118000	
Zell VEGF	576Std	0,004	4	Well 1	164200	146600	161900	1,18096269
Zell VEGF	576Std	0,004	4	Well 2	167500	157000	164700	1,22218521
Zell VEGF	576Std	0,004	4	Well 3	174200	148500	163200	1,21394071
Zell VEGF	576Std	0,025	25	Well 1	146100	137000	141100	1,05979347
Zell VEGF	576Std	0,025	25	Well 2	153000	153100	156200	1,15498001
Zell VEGF	576Std	0,025	25	Well 3	149100	153300	151300	1,13349434
Zell VEGF	576Std	0,1	100	Well 1	147500	157700	130300	1,08802465
Zell VEGF	576Std	0,1	100	Well 2				
Zell VEGF	576Std	0,1	100	Well 3	170100	179500	162300	1,2788974
Zell VEGF	576Std	0,4	400	Well 1	161600	142800	149400	1,13374417
Zell VEGF	576Std	0,4	400	Well 2	135600	149600	149300	1,08552632
Zell VEGF	576Std	0,4	400	Well 3	140100	135600	136900	1,03081279
Zell VEGF	576Std	0	0	Well 1	128500	122500	128700	
Zell VEGF	576Std	0	0	Well 2	138500	138700	134500	
Zell VEGF	576Std	0	0	Well 3	138400	135400	135600	
Zell VEGF	576Std		600	dummy				
Zell Kombi	012Std	400,025	025/400	Well 1	140800	181800	164500	1,84066003
Zell Kombi	012Std	400,025	025/400	Well 2				
Zell Kombi	012Std	400,025	025/400	Well 3	127900	152200	146800	1,61317546
Zell Kombi	012Std	800,025	025/800	Well 1	147700	138000	152000	1,65398665
Zell Kombi	012Std	800,025	025/800	Well 2	133800	125600	136900	1,49754377
Zell Kombi	012Std	800,025	025/800	Well 3	133400	118600	124400	1,42234538
Zell Kombi	012Std	400,1	100/400	Well 1	120800	137300	125800	1,45068648
Zell Kombi	012Std	400,1	100/400	Well2				
Zell Kombi	012Std	400,1	100/400	Well 3	157000	165400	143300	1,75979342
Zell Kombi	012Std	800,1	100/800	Well 1	123700	106000	119900	1,32107318
Zell Kombi	012Std	800,1	100/800	Well 2	13290	12600	12560	0,14529538
Zell Kombi	012Std	800,1	100/800	Well 3	57680	52710	56090	0,62909686
Zell Kombi	012Std	0	0/0	Well 1	90950	109200	84850	
Zell Kombi	012Std	0	0/0	Well 2	88860	84240	71610	
Zell Kombi	012Std	0	0/0	Well 3	85980	89240	88970	
Zell Kombi	072Std	400,025	025/400	Well 1				
Zell Kombi	072Std	400,025	025/400	Well 2	190600	212400	200300	201100

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	relativ
Zell Kombi	072Std	400,025	025/400	Well 3	145600	157600	139100	147433,333
Zell Kombi	072Std	800,025	025/800	Well 1	71081	68522	69942	69848,3333
Zell Kombi	072Std	800,025	025/800	Well 2				
Zell Kombi	072Std	800,025	025/800	Well 3	62080	53640	59830	58516,6667
Zell Kombi	072Std	400,1	100/400	Well 1	165500	151400	157800	158233,333
Zell Kombi	072Std	400,1	100/400	Well 2	156600	163600	155400	158533,333
Zell Kombi	072Std	400,1	100/400	Well 3	144600	136600	155800	145666,667
Zell Kombi	072Std	800,1	100/800	Well 1	145000	131400	140100	138833,333
Zell Kombi	072Std	800,1	100/800	Well 2	150400	154100	154000	152833,333
Zell Kombi	072Std	800,1	100/800	Well 3	123500	138600	117700	126600
Zell Kombi	072Std	0	0/0	Well 1	106300	100300	93100	
Zell Kombi	072Std	0	0/0	Well 2	106700	96480	106500	
Zell Kombi	072Std	0	0/0	Well 3	115900	109200	124000	
Zell Kombi	216Std	400,025	025/400	Well 1				
Zell Kombi	216Std	400,025	025/400	Well 2	181600	161600	161800	1,64172473
Zell Kombi	216Std	400,025	025/400	Well 3	89210	84220	86470	0,84491932
Zell Kombi	216Std	800,025	025/800	Well 1				
Zell Kombi	216Std	800,025	025/800	Well 2	146700	144300	187800	1,5565501
Zell Kombi	216Std	800,025	025/800	Well 3	154300	138000	141200	1,40928252
Zell Kombi	216Std	400,1	100/400	Well 1	155000	143700	154100	1,47202566
Zell Kombi	216Std	400,1	100/400	Well 2	125100	119800	122200	1,1934201
Zell Kombi	216Std	400,1	100/400	Well 3	123600	126000	122000	1,20804933
Zell Kombi	216Std	800,1	100/800	Well 1	260800	227400	243100	2,37741247
Zell Kombi	216Std	800,1	100/800	Well 2	88480	93910	82690	0,86175919
Zell Kombi	216Std	800,1	100/800	Well 3	102200	106400	95030	0,98708293
Zell Kombi	216Std	0	0/0	Well 1	106800	86310	98240	
Zell Kombi	216Std	0	0/0	Well 2	127100	109400	115600	
Zell Kombi	216Std	0	0/0	Well 3	100400	93160	85800	
Zell Kombi	360Std	400,025	025/400	Well 1	149800	165500	165600	1,69217777
Zell Kombi	360Std	400,025	025/400	Well 2	177900	183200	177400	1,89485907
Zell Kombi	360Std	400,025	025/400	Well 3	146800	160200	137700	1,5647982
Zell Kombi	360Std	800,025	025/800	Well 1	176400	153900	173800	1,77381329
Zell Kombi	360Std	800,025	025/800	Well 2				
Zell Kombi	360Std	800,025	025/800	Well 3	158400	158400	154300	1,6576938
Zell Kombi	360Std	400,1	100/400	Well 1	161600	188100	168100	1,82202048
Zell Kombi	360Std	400,1	100/400	Well 2	208900	212600	230000	2,29248038

Versuch	Zeitpunkt	KonzV	KonzT	Well	Wert1	Wert2	Wert 3	relativ
Zell Kombi	360Std	400,1	100/400	Well 3	146700	149000	164600	1,61969105
Zell Kombi	360Std	800,1	100/800	Well 1	136700	141300	145200	1,48914459
Zell Kombi	360Std	800,1	100/800	Well 2	190900	192300	182400	1,99021781
Zell Kombi	360Std	800,1	100/800	Well 3				
Zell Kombi	360Std	0	0/0	Well 1	95200	99980	10300	
Zell Kombi	360Std	0	0/0	Well 2	127200	108900	103300	
Zell Kombi	360Std	0	0/0	Well 3	88690	100300	118700	
Zell Kombi	576Std	400,025	025/400	Well 1	169700	169500	186900	1,87107673
Zell Kombi	576Std	400,025	025/400	Well 2	163700	163500	165600	1,75264515
Zell Kombi	576Std	400,025	025/400	Well 3	154900	149400	162700	1,66088735
Zell Kombi	576Std	800,025	025/800	Well 1	147700	144800	125400	1,486263
Zell Kombi	576Std	800,025	025/800	Well 2				
Zell Kombi	576Std	800,025	025/800	Well 3	163600	165900	159200	1,73806348
Zell Kombi	576Std	400,1	100/400	Well 1	108600	112600	105100	1,16048724
Zell Kombi	576Std	400,1	100/400	Well 2				
Zell Kombi	576Std	400,1	100/400	Well 3	126700	120400	130700	1,34364719
Zell Kombi	576Std	800,1	100/800	Well 1				
Zell Kombi	576Std	800,1	100/800	Well 2	114100	116100	116700	1,23375122
Zell Kombi	576Std	800,1	100/800	Well 3	91030	112800	106800	1,10475682
Zell Kombi	576Std	0	0/0	Well 1	103600	108500	104200	
Zell Kombi	576Std	0	0/0	Well 2				
Zell Kombi	576Std	0	0/0	Well 3	83210	83790	79050	



## **7.6 Publikationsliste**

### **7.6.1 Vortrag**

Moser N, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M, Schliephake H (Göttingen, Essen); (2012); Einfluss der kombinierten Freisetzung von rhBMP2 und rhVEGF165 aus PDLLA/Calciumcarbonat-Gerüsten auf die In vitro- Aktivität der Angiogenese und Osteogenese; 62. Kongress der deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie; Freiburg (MOSER N).

### **7.6.2 Schriftliche Veröffentlichung**

Schliephake H, Vucak M, Boven J, Backhaus S, Annen T, Epple M (2015): Solvent free production of porous PDLLA/calcium carbonate composite scaffolds improves the release of bone growth factors. *Oral Maxillofac Surg* 19, 133-141

## 7.7 Danksagung

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

Ebenso gilt mein Dank den wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern der Abteilung, vor allem Frau Jutta Schulz.

Mein Dank gilt Dr. C. Dullin, der mir die mikrocomputertomographischen Aufnahmen der Implantate zur Verfügung gestellt hat.

Zusätzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Medizinischen Statistik, insbesondere bei Prof. Dr. F. Konietschke und David Ellenberger, die mich bei den Auswertungen unterstützt haben, bedanken.