

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)

Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Radiomorphometrische Untersuchung der
Knochenregeneration in vivo durch
kombinierte Freisetzung von VEGF und BMP
aus den PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anna Rau

aus

Shajrem (KAZ)

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
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: 22.02.2021.

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Radiomorphometrische Untersuchung der Knochenregeneration in vivo durch kombinierte Freisetzung von VEGF und BMP aus den PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Knochengewebe	1
1.2	Regeneration von Knochendefekten	2
1.2.1	Phasen der Knochendefektheilung	2
1.2.2	Osteoblasten und Osteoblastogenese	3
1.2.3	Angiogenese	4
1.3	Einheilung von Knochentransplantaten	5
1.3.1	Osteoinduktion und Physiologie der Osteoinduktion	5
1.3.2	Osteokonduktion	7
1.4	Übersicht verschiedener Knochenersatzmaterialien	8
1.4.1	Autogene Transplantate	8
1.4.2	Allogene Transplantate	9
1.4.3	Xenogene Transplantate	10
1.4.4	Alloplastische Implantate	10
1.5	Wachstumsfaktoren	11
1.5.1	Gefäßneubildung	12
1.5.2	VEGF	12
1.5.3	BMP	12
1.6	Trägersysteme für Wachstumsfaktoren	13
1.7	Freisetzungsphysiologie von Wachstumsfaktoren	15
1.8	Fazit und Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Implantatherstellung	18
2.1.1	Wachstumsfaktoren	18
2.1.2	Implantat	18
2.2	Versuchstiere und Tierhaltungsbedingungen	19
2.3	Einteilung und Größe der Tiergruppen	19
2.4	Operatives Vorgehen	20
2.4.1	Narkose	20
2.4.2	Operation	20
2.5	Postoperatives Vorgehen	22
2.6	Versuchsbeendigung	22
2.7	Aufbereitung der Präparate	23
2.8	Digitale Volumentomographie	23

2.9	Herstellung der DVTs.....	24
2.10	Auswertung mit digitalen Programm.....	24
2.10.1	Isolation Einzelkiefer	24
2.10.2	Analyse	24
2.11	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Knochendichte	27
3.1.1	BMP.....	27
3.1.2	VEGF	28
3.1.3	Kombination BMP/VEGF	29
3.1.4	Vergleich der Knochendichte der Einzeldosierungen von BMP und Kombinationen VEGF/BMP	30
3.2	Knochenfläche	31
3.2.1	BMP.....	31
3.2.2	VEGF	32
3.2.3	Kombination BMP/VEGF	33
3.2.4	Vergleich der Knochenfläche der Einzeldosierungen von BMP und Kombinationen VEGF/BMP	34
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	35
4	Diskussion.....	36
4.1	Diskussion der Methode.....	37
4.1.1	Wachstumsfaktoren.....	37
4.1.2	Herstellung der Implantate	38
4.1.3	Tiermodell.....	39
4.1.4	Durchführung der Auswertung.....	40
4.2	Diskussion der Ergebnisse	40
4.3	Ausblick	43
5	Zusammenfassung	44
6	Anhang.....	45
6.1	Tabellen zur statistischen Analyse der Knochendichte.....	45
6.2	Tabellen zur statistischen Analyse der Knochenfläche	48
7	Literaturverzeichnis	55

1 Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
Col1a	Kollagen-I
Co-Smad	<i>common-Smad</i>
DICOM	<i>digital imaging and communications in medicine</i>
Dlx5	<i>distal-less homebox 5</i>
DVT	<i>dentales Volumetomogramm</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOV	<i>field of view</i>
HA	Hydroxylapatit
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
IL	Interleukin
I-Smad	inhibitorisches Smad
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MSC	<i>mesenchymal stemm cell</i>
Osx	<i>osterix</i>
PDGF	<i>platelet- derived growth factor</i>
PDLLA/CaCO ₃	<i>poly-d l-lactic acid/calciumcarbonat</i>
RANKL	<i>receptor activator of necrofactor kappaB-ligand</i>
rh	<i>recombinant human</i>
R-Smad	rezeptorreguliertes Smad
Runx2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
Smad	<i>screening for mutans (sma), mothers against decapentaplegic (mad)</i>
Smurf	<i>Smad-ubiquitination related factors</i>
TAK1	<i>transforming growth factor beta-activated kinase</i>
TCP	Trikalziumphosphat
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>

TNF α *tumor necrosis factor alpha*

VEGF *vascular endothelial growth factor*

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe

Das Knochengewebe ist ein hochdifferenziertes Binde- und Stützgewebe, welches sich an die biomechanischen Anforderungen durch Zug, Druck, Biegung und Torsion anpasst. Als spezialisiertes Bindegewebe besteht die extrazelluläre Matrix des Knochengewebes zu 25% aus Wasser, zu 30% aus organischem Material und zu 45% aus den Mineralien Kalzium, Phosphor, Magnesium und Natrium. Die mineralisierte extrazelluläre Matrix, in die die Knochenzellen eingebettet sind, besteht überwiegend aus den Mineralien Kalzium, Phosphor, Magnesium und Natrium, kollagenen und nicht kollagenen Proteinen. Das Strukturprotein des Knochens ist Kollagen-I, welches 90% des organischen Materials ausmacht. Die übrigen 10% der Proteine übernehmen verschiedene regulierende Funktionen, wie z. B. Wachstumsfaktoren deren Anteil auf unter 1% sich beläuft (Gradinger und Gollwitzer 2006). Das Kollagen ist im reifen Knochen lamellenartig (Lamellenknochen) und im unreifen Knochen als Geflecht (Geflechtknochen) konfiguriert. Beide Anteile des Knochengewebes, Spongiosa und Kortikalis bestehen aus Lamellenknochen. Die Lamellen des kortikalen Knochengewebes sind konzentrisch um die Blutgefäße angeordnet. Die so gebildeten zylindrischen Einheiten werden als Havers-Kanäle oder Osteone genannt. Im Gegensatz dazu weisen die Spongiosabälkchen eine unregelmäßige Anordnung der Lamellen ohne zentrale Gefäßkonfiguration auf. In den so entstandenen Hohlräumen befindet sich das Knochenmark (Welsch 2006).

Die Zellen der Knochenmatrix sind Osteoblasten, die das Knochengewebe bilden, Osteoklasten, die für den Knochenabbau zuständig sind und Osteozyten, welche den Knochenstoffwechsel unterhalten. Die Osteoblasten sind vollständig ausdifferenzierte Zellen und befinden sich an der Oberfläche des Geflechtknochens. Sie sind für die Produktion von Knochenmatrix verantwortlich und sezernieren Kollagen-I und andere nichtkollagene Proteine. Damit bilden sie das nichtmineralisierte Osteoid.

Die Osteoklasten gehören dem Monozyten-Makrophagen-System an und kommen in geringer Zahl an Knochenoberflächen vor. Sie sind vor allem an Orten der Umbauvorgänge zu finden. Dabei lösen sie den mineralisierten Knochenanteil auf und führen durch Degradation von Proteinen zur Resorption des Knochens (Junqueira und Carneiro 2005).

Die Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor und sind von verkalkter Grundsubstanz umgeben. Es werden osteoblastische und osteolytische Osteozyten unterschieden. Die osteoblastischen Osteozyten dienen dem Erhalt der Grundsubstanz durch die Speicherung von Kalziumphosphat im Zytoplasma. Die osteolytischen Osteozyten bauen Hartsubstanz ab und setzen Kalzium frei.

Das Knochengewebe ist von einer Bindegewebsschicht, dem Periost umgeben. Dieses trägt zur Ernährung des Knochens mit Hilfe der enthaltenen Gefäße bei und ist reich an Nerven.

Von Innen liegt der Kortikalis das Endost an, das wie das Periost an den Umbauvorgängen des Knochens beteiligt ist (Junqueira und Carneiro 2005). Das Knochengewebe mit einem Hohlraumanteil passt sich in seiner Architektur den Anforderungen an und wirkt somit formgebend und stabilisierend (Speckmann 2008).

1.2 Regeneration von Knochendefekten

Die biologischen Prozesse in der Knochenneubildung, der Einheilung von Knochen und Knochenersatzmaterialien und die Osseointegration von Implantaten haben einen identischen Heilungsablauf. Sie sind chronologisch gekennzeichnet durch die Herabregulation der Osteoklastenaktivität, das chemotaktische Anlocken und Proliferation von Osteoprogenitorzellen, die Differenzierung zu kollagensezernierenden Osteoblasten, die Bildung einer mineralisierten Knochenmatrix und letztendlich die Reduktion der Osteoblastenaktivität (Summers 1994).

Für die Defektheilung des Knochens gelten grundsätzlich die gleichen Prinzipien wie für die sekundäre Knochenheilung (Towfigh et al. 2011).

Nach der Entstehung eines Knochendefektes wird zunächst bindegewebiger Kallus gebildet und führt im Defektbereich zur Stabilisierung und zum Auffüllen des Defektvolumens. Dieser wird anschließend in stabilen Knochen umgewandelt. Eine erforderliche strenge Ruhigstellung und anatomische Annäherung sind oft nicht realisierbar und nachgewiesenermaßen führen Mikrobewegungen und Gewichtsbelastung zur besseren Regeneration. Es muss jedoch ein Mittelweg zwischen zu viel und zu wenig Bewegung gefunden werden, denn zu viel Bewegung und Gewichtsbelastung führen zur Pseudarthrosenbildung und Fehlstellung (Green et al. 2005).

1.2.1 Phasen der Knochendefektheilung

Der Regenerationsprozess beginnt unmittelbar nach dem Trauma. Nach Bildung eines Hämatoms und Nekrose des fraktur-nahen Gewebes kommt es zur Phase der Inflammation. Die akute inflammatorische Reaktion erreicht ihren Höhepunkt nach 24 Stunden und ist nach 7 Tagen abgeklungen (Cho et al. 2002).

In der initialen proinflammatorischen Phase werden Akute-Phase-Proteine (Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11 und IL-18) in inflammatorischen Zellen im Hämatom gebildet und dienen zum Fortschreiten der Entzündungsreaktion und Gefäßneubildung (Gerstenfeld et al. 2003). TNF α , welches von Makrophagen und anderen Entzündungszellen exprimiert wird erreicht seinen Konzentrationshöhepunkt 24 Stunden nach Trauma. Es führt zur Induktion der zweiten inflammatorischen Kaskade und zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Kon et al. 2001). Im weiteren Verlauf differenzieren die mesenchymale Stammzellen, welche aus dem Knochenmark und den umgebenden Weichgewebe stammen zu

osteogenen Zellen (Zhang 2010; Lüllmann-Rauch 2006). Diese Differenzierung unterliegt einer komplexen molekularen Kaskade, welche noch nicht in Gänze verstanden ist (Marsell und Einhorn 2011).

IL-1 wird von den Makrophagen produziert, induziert die IL-6 Produktion in Osteoblasten, fördert die Angiogenese und die Bildung des primären Knorpels (Kon et al. 2001; Lee und Lorenzo 2006).

IL-6 stimuliert die Produktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und die Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten (Yang et al. 2007).

Wichtige Rolle in der Umwandlung von Knorpelgewebe in einen stabilen mineralisierten Knochen spielen die desmale und die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation kommt es nach Differenzierung von MSCs zu osteogenen Zellen zur Bildung von Osteoid. Dieses verkalkt durch Einlagerung von Kalziumphosphat und bildet Geflechtknochen. Durch anschließende Umbauprozesse wird der Geflechtknochen in den Lamellenknochen umgewandelt.

Die chondrale Ossifikation beschreibt die Knochenregeneration über die Bildung eines knorpeligen Gerüsts. Das gebildete Knorpelgewebe wird abgebaut und durch Knorpelgewebe ersetzt (Welsch 2006).

1.2.2 Osteoblasten und Osteoblastogenese

Osteoblasten sind mesenchymale Zellen und werden zeitlebens neu gebildet. Sie sind zuständig für die Synthese von Kollagen und die Steuerung der Mineralisation. Sie regulieren nicht nur den Knochenaufbau sondern auch den Knochenabbau durch die Überwachung des Osteoklastenhaushalts mit Hilfe von Botenstoffen. So fördert z.B. das von Osteoblasten sezernierte Zytokin *macrophag colony-stimulating factor* (M-CSF) die Proliferation der Osteoklastenvorläufer. Das membranständige Protein *receptor activator of necrofactor kappaB-ligand* (RANKL), welches sich auf der Oberfläche von Präosteoblasten befindet, ist für die Fusion, Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten zuständig. Dabei interagiert der RANK-Ligand mit dem RANK-Rezeptor auf den Osteoklasten und Osteoklastenvorläufern. Die Steuerung des Prozesses vollzieht sich über die kompetitive Bindung von Osteoprotegerin (OPG), Wachstumsfaktoren und Hormonen an den Rezeptoren (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten wird durch Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle beeinflusst. Unter den Einfluss von *transforming growth factor beta* (TGF- β) und *bone morphogenic protein* (BMP) startet die Osteoblastendifferenzierung (Abbildung 1) und wird in jedem Schritt von den Wachstumsfaktoren beeinflusst. Den Differenzierungsweg der Osteoblasten starten Initiatorproteine. Sie führen zur Differenzierung der Osteoprogenitorzellen. In diesen Zellen startet die *runt-related transcription factor 2* (Runx2)-Expression. Runx2 ist ein Transkriptionsfaktor der frühen Differenzierungsphase. Die Runx2 - exprimierenden Zellen können sich je nach Zellsignal in Osteoblasten oder Chondrozyten differenzieren und damit

in die desmale sowie chondrale Osteogenese eingreifen. Anschließend bilden sich mit Hilfe von Runx2-Expression Präosteoblasten. Es kommt außerdem zur Expression von Markerproteinen alkalische Phosphatase (AP) und Kollagen-I (Col1a). Im nächsten Schritt bilden sich aus Präosteoblasten Osteoblasten, welche für die Osteoblasten typischen Markerproteine AP, Col1a, Runx2, Osteocalcin (OC), Knochensialoprotein (BSP), Osteopontin und Osterix (Osx) exprimieren. Dabei spielt Osx als osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor für die Rückkopplung bei der Osteoblastendifferenzierung eine wichtige Rolle. Die Proteine AP, Col1a und BSP dienen der Produktion der extrazellulären Matrix. Osteocalcin und Osteopontin dienen der Mineralisation der extrazellulären Matrix (Zhang 2010).

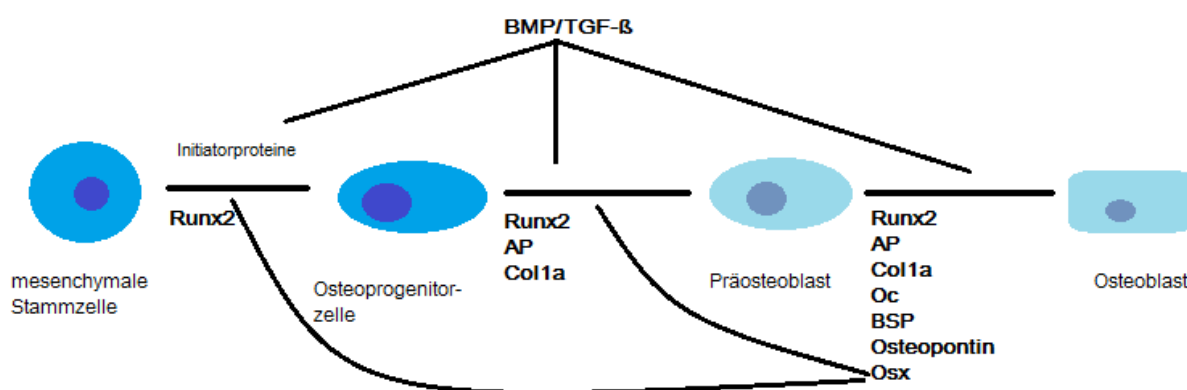


Abbildung 1: Osteoblastendifferenzierung

1.2.3 Angiogenese

Für die erfolgreiche Osteogenese ist die Blutversorgung durch Vaskularisation unerlässlich. Bei der chondralen Ossifikation organisiert sich das initial entstandene Hämatom und neben den Fibroblasten wandern Endothelzellen v.a. aus dem Periost ein. Diese führen zur Bildung neuer Kapillaren.

Der Vaskularisationsprozess (Abbildung 2) wird auf zwei unterschiedlichen Wegen reguliert, zum einen durch Angiopoetin und zum anderen durch VEGF. Die Angiopoetin-abhängige Angiogenese gehört zu der frühen Phase der Frakturheilung. Es bedingt die frühe Gefäßeinsprossung aus dem Periost (Keramaris et al. 2008).

Das hypoxische Areal des Hämatoms und des frühen Frakturkallus aktivieren den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF). Dieser Transkriptionsfaktor steuert Mechanismen zur Anpassung an das Hypoxiegebiet. Eines der Zielgene des HIF ist VEGF (Fan et al. 2014). Das gebildete VEGF führt zur Invasion der Blutgefäße und Umwandlung des gebildeten Knorpels in vaskularisierten Knochen (Keramaris et al. 2008).

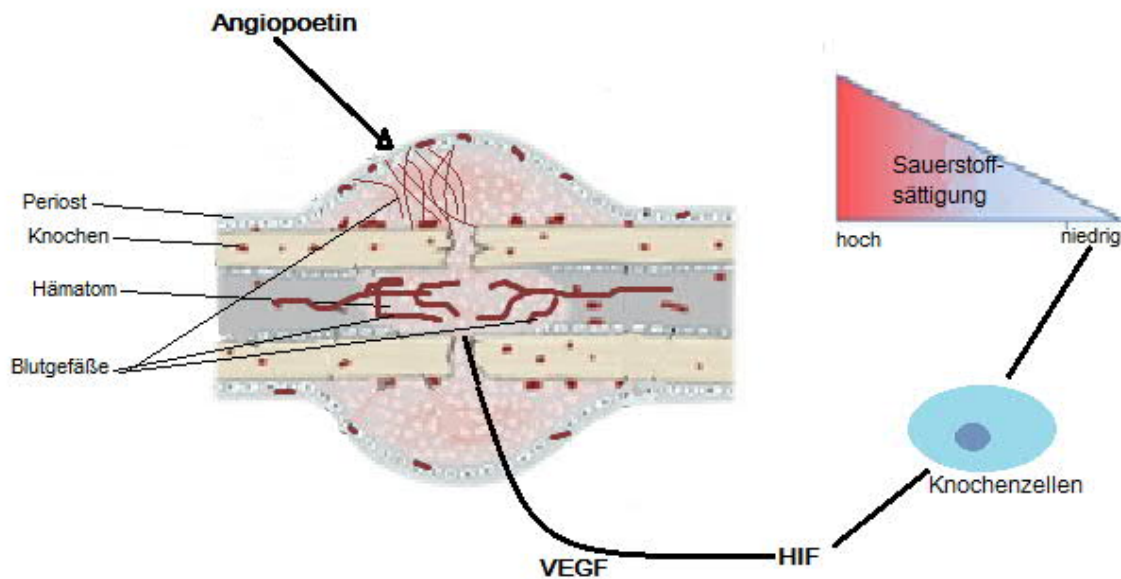


Abbildung 2: Angiogenese

1.3 Einheilung von Knochentransplantaten

1.3.1 Osteoinduktion und Physiologie der Osteoinduktion

Die Integration des körpereigenen oder körperfremden implantierten Materials im Knochen läuft in einer ähnlichen Reaktion wie die Frakturheilung ab. Die Integration eines Implantates wird in drei Phasen unterteilt: Osteoinduktion, Osteokonduktion, Osteointegration (Albrektsson und Johansson 2001).

Osteoinduktion als Teil der physiologischen Knochenheilung ist verantwortlich für den größten Teil an neu gebildeten Knochen. Es beschreibt einen Prozess bei dem die Osteogenese durch Migration und Differenzierung der MSCs induziert wird.

Durch den operativen Eingriff gelangt Blut an die Implantatoberfläche und die Zerstörung der Knochensubstanz führt zur Freisetzung von gespeicherten Wachstumsfaktoren. Die im initialen Hämatom enthaltenen Thrombozyten sind ebenfalls Quelle für Wachstumsfaktoren (Gradinger und Gollwitzer 2006).

Die TGF- β -Faktorenfamilie und BMPs transduzieren intrazelluläre Signale über Smad-Komplex und mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade.

Smad ist das humane Homolog von *screening for mutants* (sma) aus *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und *mothers against decapentaplegic* (mad) aus *Drosophila* zur Regulation am Serin/Threonin-Rezeptor.

Smad-Moleküle lassen sich in drei Gruppen unterteilen: rezeptorreguliertes Smad (R-Smad), *common*-Smad (Co-Smad) und inhibitorisches Smad (I-Smad). Die R-Smad1/5/8 übertragen BMP-Signale, Smad2 und Smad3 sind für die Übermittlung der TGF- β -Signale verantwortlich.

Das Co-Smad4 bildet mit R-Smad einen Komplex zur Aktivierung der Transduktion. I-Smad sind Smad6 und Smad7, sie inhibieren zusammen mit *Smad-ubiquitination related factors* (Smurf) 1 und 2 die Kaskaden.

Die Smad-Kaskade (Abbildung 3) wird durch die Bindung von aktivierten TGF- β und BMP aus der extrazellulären Matrix an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran gestartet. Diese Bindung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptorkomplexe, welche die jeweiligen R-Smad-Untereinheiten von TGF- β und BMP aktivieren. Die aktivierten R-Smad bilden mit Co-Smad einen Komplex, welcher die Signalübertragung in den Zellkern durch Phosphorylierung ermöglicht. Im Zellkern wird die Transkription von Zielgenen Runx2, Osx und Dlx5 gestartet.

Bei der Smad-unabhängigen Kaskade (Abbildung 3) rekrutiert phosphorylierte Kinase 1 (TAK1), welche durch Bindung von Wachstumsfaktoren BMP und TGF- β an Rezeptorkomplexen aktiviert wurde, das TAK1-Bindungsprotein (TAB1) und startet mitogen aktivierte Proteinkinase (MKK) p38- oder den MKK-*extracellular-signal-regulated-kinase* (ERK)1/2-Signalweg. Nach der Signaltransduktion erfolgt die Aktivierung durch Phosphorylierung und Beginn der Transkription von Zielgenen im Zellkern (Wu et al. 2016).

Die Signalkaskaden werden auf unterschiedliche Art und Weise durch extrazelluläre Matrixproteine, I-Smads, Ubiquitin (Ub)-Proteasom-System, mikroRNAs, Co-Repressoren und Co-Faktoren kontrolliert.

Die extrazellulären Matrixproteine binden kovalent an die Wachstumsfaktoren und beschränken deren Verfügbarkeit zur Bindung an den spezifischen Rezeptoren. Die Abspaltung der Matrixproteine führt zur Bindung und anschließender Aktivierung der Kaskade.

Die I-Smad binden kompetitiv an den Rezeptoren und verhindern damit die Phosphorylierung von R-Smad. Außerdem führen sie zur Degradation von R-Smads durch Rekrutierung von Ubiquitinligasen Smurf1 und Smurf2 über Ubiquitin-Proteasom-System.

Die Stabilität der Weiterleitungsproteine von BMP und TGF- β wird durch die Ubiquitinenzyme kontrolliert. Smurf als Ubiquitinligase bindet an R-Smad-Rezeptoren, an R-Smad-Komplexe, an Runx2, an MKK und führt damit zum Abbau der Proteine. Die Kaskaden werden nicht nur negativ durch das Ubiquitin-Proteasom-System kontrolliert, sondern können über andere Ligasen z.B. Arkadia, die I-Smads als Repressoren abbauen und damit die Signalwege positiv beeinflussen.

Intranukleär wird die Expression und Transduktion von Zielgenen durch mikroRNAs, Co-Repressoren und Co-Faktoren beeinflusst. Die Co-Faktoren wie P300 greifen positiv in die Zielgenexpression ein, in dem sie im Chromatin Histone azetylieren.

Die TGF- β - und BMP-Signalkaskaden interagieren mit anderen Signalmolekülkaskaden wie z. B. Wingless (Wnt)-Signalweg. Sie initiieren und inhibieren auf unterschiedlichen Stufen die Moleküle (Wu et al. 2016).

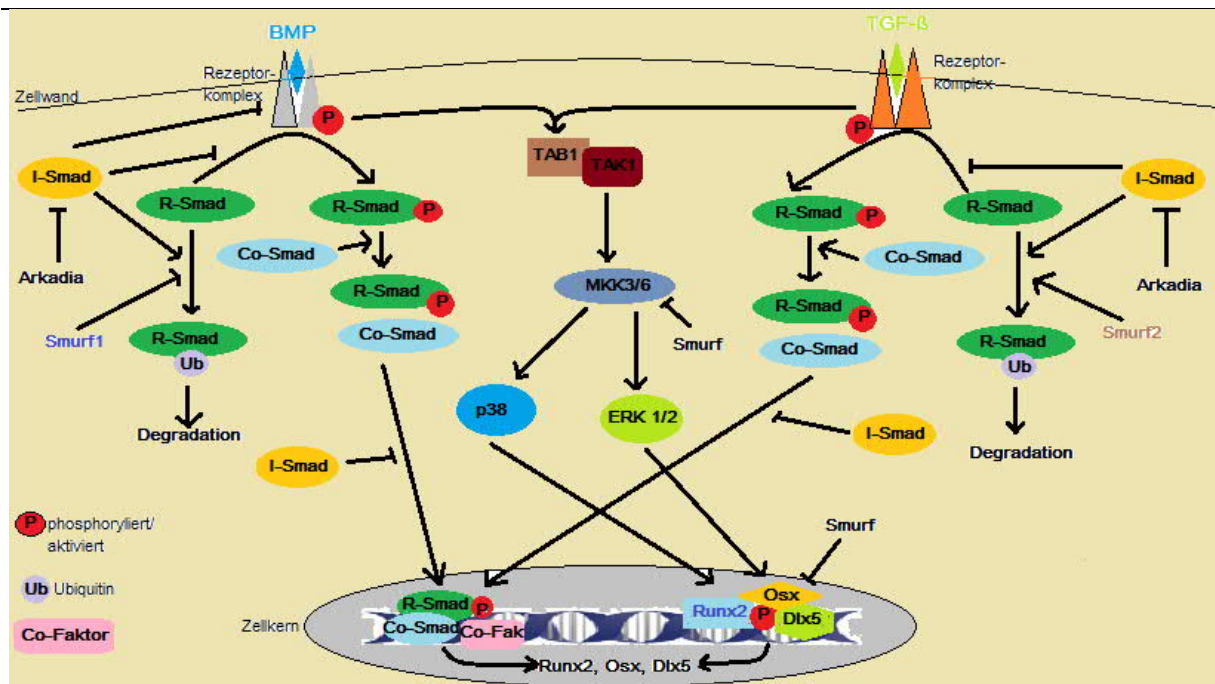


Abbildung 3: Smad-abhängige und Smad-unabhängige Kaskade

1.3.2 Osteokonduktion

Beim knöchernen Einbau von Implantaten ist die Osteokonduktivität unerlässlich. Die Osteokonduktion beschreibt einen passiven Prozess, bei dem durch eine mikrostrukturierte und poröse Implantatoberfläche die knöchernen Integration ermöglicht wird. Diese Eigenschaften von Implantaten führen über Fibrinogenabsorption, Thrombozytenaktivierung sowie -adhäsion zum Anhaften von osteoblastären Zellen und zur Knochenbildung an der Implantatoberfläche. Dabei ist die erfolgreich verlaufene Osteoinduktion ein wichtiges Kriterium für Osteokonduktion (Albrektsson und Johansson 2001).

Im Gegensatz dazu dienen resorbierbare Implantate lediglich als dreidimensionale Leitschiene für die Gefäßeinsprossung und Einwanderung von Osteoprogenitorzellen (Gradinger und Gollwitzer 2006).

Entscheidend für die Integration oder Abstoßung von Implantaten ist die biologische Reaktion auf Rauigkeit, Ladung und chemische Zusammensetzung. Die Absorption von Proteinen an der Implantatoberfläche vollzieht sich unmittelbar nach Implantation durch chemische, dispersive (van-der-Wals) und elektrochemische Wechselwirkung. Dadurch ändern die Proteine ihre Struktur und werden teilweise abgebaut. Die so entstandene Proteinschicht an der Implantatoberfläche bildet das Substrat für die Zellanhaftung über spezifische Ligandrezeptorbindungen. Im Folgenden kommt es zur Auslösung intrazellulärer Kaskaden, welche Auswirkungen auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen haben (Gradinger und Gollwitzer 2006).

1.4 Übersicht verschiedener Knochenersatzmaterialien

Der Verlust von Knochengewebe, der durch Verletzungen, Fehlbildungen, Infektionen oder Tumorerkrankungen entsteht, führt zu einer erhöhten Morbidität sowie zu einer Vielzahl sozioökonomischer Probleme. Der demographische Wandel und die steigenden Patientenerwartungen führen zur steigenden Komplexität der klinischen Szenarien und bieten somit die Voraussetzung zur Entwicklung zuverlässiger Knochendefektheilungsstrategien.

Um verbesserte und reproduzierbare Strategien zur Knochendefektheilung zu schaffen wird aktuell an Stammzellen, innovativen Gerüsten und biologischen Faktoren geforscht (Black et al. 2015).

Zur Knochendefektregeneration wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Diese haben als Ziel nicht nur die Wiederherstellung der Form und der Funktion, sondern auch die Verbesserung der Regeneration des Knochengewebes. Es stehen verschiedene Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Funktionswiederherstellung, Biokompatibilität und Stabilität zur Verfügung. Prinzipiell werden synthetische Materialien von biologischen Transplantaten unterschieden. Die durch das Ersatzmaterial begünstigte Knochenheilung soll einen vitalen und belastungsfähigen Knochen hervorbringen.

Theoretisch lassen sich folgende Eigenschaften eines „idealen“ Knochenersatzmaterials formulieren (Rueger 1992): guter knöcherner Ein- und Umbau, chemische und physikalische Stabilität, keine immunologischen Abstoßungsreaktionen, frei von toxischen und mutagenen Nebenwirkungen, Sterilisierbarkeit, einfache Bearbeitung, keine Lagerungs- oder Mengenbeschränkung, freie Form- und Größenauswahl, niedrige Kosten.

Es werden jährlich mehr als 2,2 Millionen Knochentransplantationen weltweit durchgeführt. Als aktueller Goldstandard gilt die Transplantation von autogenen Knochen von einer anderen Körperregion des Patienten (Hannik und Arts 2011). Allogene, xenogene und alloplastische Ersatzmaterialien bilden die Alternativen bei der Behandlung von Knochendefekten.

1.4.1 Autogene Transplantate

Autogene Transplantate stammen vom gleichen Individuum und werden in vaskularisierte und nicht vaskularisierte Spongiosa-, Monokortikal- und Bikortikaltransplantate eingeteilt. Bei korrekter Operationstechnik (Entnahme und Verpflanzung) stellen die autogenen Transplantate nicht nur das Knochengestüt, sondern enthalten neben osteogenen Vorläuferzellen und Osteoblasten auch Wachstumsfaktoren zur Osteoinduktion (Biberthaler und van Griensven 2017).

Für die Entnahme der Spongiosa eignen sich Beckenkamm, Oberschenkelknochen, lateraler Anteil und distaler Anteil des Schienbeins. Der kortikale Knochen wird von Wadenbein, Rippen und Beckenkamm entnommen. Bei kleineren Mengen wird zur Defektfüllung

Knochengewebe aus der Umgebung der Defektzone entnommen (Finkemeier 2002). Die biologischen und mechanischen Eigenschaften der autogenen Transplantate und v.a. das Fehlen der immunologischen Reaktion bieten den größten Vorteil gegenüber den anderen Knochenersatzmaterialien (Biberthaler und van Griensven 2017). Der Nachteil der autogenen Knochenübertragung liegt zum einen an der Verfügbarkeit, da das entnehmbare Knochenvolumen beschränkt ist und zum anderen an der operativen Prozedur der Entnahme des Knochentransplantats. Diese ist nicht nur mit der längeren Narkosezeit, sondern auch mit einer erheblichen Morbidität, wie Schmerzen an der Entnahmestelle, Infektionsrisiko des Donorgebiets und Hämatombildung assoziiert. Auch Frakturen und Verletzung anatomisch wichtiger Strukturen zählen zu Komplikationen der autogenen Transplantation (Wippermann et al. 1997; Gielkens et al. 2008; Biberthaler und van Griensven 2017).

1.4.2 Allogene Transplantate

Beim allogenen Knochenersatz handelt es sich um Transplantat von einem Spender der gleichen Spezies. Durch allogene Transplantate können infektiöse Erkrankungen mit Erregern wie HIV (humanes Immundefizienzvirus), Hepatitisvirus und TSE (*transmissible spongiform enzephalopathy*, z.B. Creuzfeld-Jakob-Enzephalopathie) übertragen werden. Außerdem sind durch die Fremdspende immunologische Reaktionen zu erwarten. Um dieses Risiko zu begrenzen sind unterschiedliche Verfahren zur Spenderknochenbehandlung entwickelt worden. Das Ziel ist die zellulären Bestandteile zu entfernen und die biomechanischen Eigenschaften zu erhalten (De Long et al. 2007). Dazu stehen zahlreiche chemische und physikalische Verfahren zur Verfügung. Neben der Sterilisation mit Säure, Ethanol, Hitze und Gammastrahlen stehen Kombiverfahren zur Verfügung (Endres et al. 2005).

Die durch die Sterilisation entstandenen Transplantate haben lediglich osteokonduktive Eigenschaften und führen zu zahlreichen Komplikationen wie fehlende Einheilung, verminderte Substanzdichte und erhöhte Frakturneigung (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Aktuell werden v.a. in den USA allogene Transplantate mit Gefriertrocknung angewandt. Es werden dadurch die osteoinduktiven und biomechanischen Eigenschaften des transplantierten Knochens verbessert, was aber mit einem höheren Infektionsrisiko einhergeht.

Im klinischen Alltag haben sich *demineralised bone matrix* (DBM)-Transplantate durchgesetzt. Es wird durch die Dekalzifizierung demineralisierter Knochenersatz hergestellt, welcher das Infektionsrisiko und Immunogenität deutlich reduziert und verbesserte osteoinduktive Eigenschaften als gefriergetrocknete Transplantate besitzt (Graham et al. 2010).

1.4.3 Xenogene Transplantate

Xenogene Transplantate stammen von einer anderen Spezies und können bovinen, equinen, porcinen und koralinen Ursprungs sein. Es handelt sich um deproteinisiertes Material, welches durch Einwachsen von Knochen in den Gerüstzwischenräumen osteokonduktiv wirkt und resorbiert werden kann (Baldini et al. 2011). Da es sich um Fremdmaterial handelt besteht grundsätzlich die Gefahr der Keimübertragung und der immunologischen Reaktion. Deshalb müssen xenogene Transplantate aufwendigen Sterilisations- und Demineralisierungsverfahren unterworfen werden um das mögliche Infektionsrisiko und Risiko der Abstoßungsreaktion zu senken (Prub und Katthagen 2008).

Eine mögliche Quelle für xenogene Transplantate bieten Meereskorallen. Das sind Kalziumcarbonate, die gute Eigenschaften in der Versorgung kleinerer Knochendefekte zeigen (Piatelli et al. 1997). Eine breite Anwendung finden xenogene bovine Transplantate. Als deproteinisierter spongioser Knochen dient es zum Auffüllen von oralen Knochendefekten (Baldini et al. 2011).

1.4.4 Alloplastische Implantate

Zu den alloplastischen Knochenersatzmaterialien gehören Keramiken aus Kalziumphosphat und Kalziumsulfat, Polymere und bioaktive Gläser. Es sind biokompatible und zum Teil resorbierbare Stoffe, die nicht nur am ortsständigen Knochen anwachsen sondern auch komplett von neu gebildeten Knochen ersetzt werden können. Sie dienen als Matrix für osteogene Zellen und unterstützen deren Proliferation und Differenzierung (Lane et al. 1999; Zizzari et al. 2016).

Für das erfolgreiche Einheilen der alloplastischen Materialien ist nicht nur die chemische Zusammensetzung entscheidend, vielmehr spielen die Feinstruktur, die Geometrie und mechanische Stabilität eine große Rolle (Zizzari et al. 2016).

Zu den zwei häufig verwendeten Keramiken zählen Trikalziumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit (HA). Auf Grund ihrer Biokompatibilität können sie in Knochen umgewandelt werden, sind druckfest jedoch spröde und nicht zugbelastungsstabil (De Long et al. 2007).

Das TCP hat sich im klinischen Alltag z.B. bei Sinusbodenaugmentationen oder zum präimplanteren Auffüllen der Extraktionsalveolen (*ridge preservation*) bewährt. Es zeigt einen guten Knochendurchbau mit zeitgerechtem TCP-Abbau nach 6 bis 18 Monaten. Im Vergleich wurde das HA nach 10 Jahren in situ nachgewiesen (Fillingham und Jacobs 2016; Zizzari et al. 2016).

Das HA zeigt gute osteokonduktive Eigenschaften und eignet sich als Trägerstoff für osteoinduktive Proteine (Noshi et al. 2000).

Bioaktive Gläser sind vielseitig einsetzbar und haben osteokonduktive Eigenschaften. Sie eignen sich nicht nur als Knochenersatzmaterial sondern dienen auch als Träger für Medikamente und eignen sich für den Einsatz in der Weichgewebschirurgie. Die bioaktiven Gläser haben eine niedrige Druckfestigkeit und hohe Bruchneigung. Um diesen

entgegenzuwirken werden die Herstellungsmethoden der bioaktiven Gläser verändert. Die Integration in den Knochen vollzieht sich nach dem Kontakt der bioaktiven Gläser mit dem Blut. Es bildet sich eine Doppelschicht aus Siliziumgel und Kalziumphosphat, woran die Proteine des umgebenden Knochens binden und zum chemischen Verbund führen. Die chemisch veränderten bioaktiven Gläser mit verbesserten Eigenschaften finden nicht nur in der Wirbelsäulen Chirurgie sondern auch in der Gesichtsschädelrekonstruktion Verwendung (Montazerian und Dutra Zanotto 2016).

Polymere Knochenersatzmaterialien haben ein breites Einsatzspektrum und werden in natürliche und synthetische Materialien eingeteilt. Die meisten zeigen gute mechanische Eigenschaften, sind biokompatibel und resorbierbar. Zu den Polymeren gehören Polyglykoxide, Polylaktide, Polycaprolaktone und Biopolymere wie Chitosan, Kollagen und Alginat. Biopolymere bestehen aus vielen verschiedenen Bestandteilen. Sie werden mit synthetischen Polymeren, bioaktiven Gläsern, Keramiken und Wachstumsfaktoren kombiniert (Jahan und Tabrizian 2016). Das synthetische Polymer Polylaktid wird zum Teil aus Milchsäure aufgebaut. Diese wird beim Abbau des Polylaktids frei und bewirkt eine lokale Entzündungsreaktion. Deshalb wird dem Polylaktid meist ein neutralisierender Stoff wie Kalziumkarbonat hinzugefügt (Meinig 2010).

Ungeachtet der Fortschritte und der Ergebnisse in der Knochenersatzmaterialforschung gilt bei den meisten Chirurgen der autogene Knochen als erste Wahl für die Defektversorgung. Für den Einsatz der kombinierbaren Materialien, die osteokonduktive, -induktive und -gene Eigenschaften besitzen, fehlen kontrollierte, randomisierte und prospektive Studien (De Long et al. 2007).

1.5 Wachstumsfaktoren

Die Geweberegeneration ist weitgehend von der Zell-Signalgebung abhängig, die durch zelluläre Wechselwirkungen mit Wachstumsfaktoren vermittelt wird (Almubarak et al. 2016). Wachstumsfaktoren sind polypeptid Moleküle, die an spezifische Rezeptoren der Zielzelle binden und damit eine Antwortreaktion auslösen (Rassow et al. 2008). Mit Hilfe von Wachstumsfaktoren werden mesenchymale Stammzellen rekrutiert und die Osteoblastogenese induziert. Sie nehmen somit Einfluss auf die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen in der Osteo- und Chondrogenese (Almubarak et al. 2016).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren beschrieben, die Einfluss auf die Osteogenese nehmen. Zu den bekanntesten gehören *transforming growth factor beta* (TGF- β), *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), und *fibroblast growth factor* (FGF).

1.5.1 Gefäßneubildung

Die Gefäßneubildung läuft in mehreren Schritten ab und wird von angiogenetischen Faktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Tumornekrose-Faktor alpha (TNF α), Transformations-Wachstumsfaktor alpha und beta (TGF α , β) und VEGF kontrolliert. VEGF als bekanntester und wichtigster Faktor beeinflusst die Physiologie und Pathologie der Gefäßneubildung. Es induziert die Gefäßneubildung im Sinne der Vaskulo- und Angiogenese (Cui et al. 2013). Bei der Angiogenese werden aus vorhandenen Kapillaren neue Kapillaren durch Sprossung der neuen Zellen aus den alten gebildet. Die Vaskulogenese ist demgegenüber die Entwicklung von Gefäßzellen und Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen.

1.5.2 VEGF

Die VEGF-Familie besteht aus 6 Mitgliedern: VEGF-A, -B, -C, -D, -E und Plazenta-Wachstumsfaktor. VEGF kann von vielen unterschiedlichen Zellen, wie Muskelzellen, Perizyten, Podozyten, Osteoblasten, Chondrozyten, Pneumozyten, Hepatozyten und Endothelzellen exprimiert werden (Hu und Olsen 2017). Dabei ist VEGF-A das Startprotein für die Angiogenese. Es bindet an Tyrosinkinaserzeptor VEGFR2, führt zu dessen Phosphorylierung und Aktivierung der Signalkaskade. Mit Hilfe anderer Signalmoleküle, die an den aktivierten Rezeptor binden wird die Angiogenese und Funktion der Endothelzellen kontrolliert.

Die VEGF-Rezeptoren werden nicht nur von Osteoblasten, mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert sondern auch Lymphozyten und Osteoklasten können das VEGF direkt binden. Damit kann das VEGF auf die Mineralisation in Osteoprogenitorzellen Einfluss nehmen, die Aktivität der alkalischen Phosphatase ändern sowie die Migration und Differenzierung von Osteoblasten beeinflussen (Cui et al. 2013).

Durch die Blockade der VEGF-Rezeptoren konnte die Rolle des VEGF bei der Frakturheilung und Knochenmineralisierung in Tierexperimenten nachgewiesen werden (Keramaris et al. 2008).

1.5.3 BMP

1965 beobachtete Marshall Urist im Rahmen eines Tierversuches nach Implantation von demineralisiertem, allogenen Knochen in Muskelgewebe, dass die extrazelluläre Matrix des Knochens die Fähigkeit enthält, eine neue Knochenbildung zu induzieren. Diese Substanz wurde später aus Knochensubstanz isoliert und als *bone morphogenetic protein* (BMP) bezeichnet. Seit dem wurden BMP's ausführlich untersucht (Elliot Carlisle und Fischgrund 2005).

Dabei handelt es sich um aus zwei identischen Polypeptidsträngen aufgebautes Protein. Es sind mehr als 15 unterschiedliche BMP's bekannt, wobei BMP-2 und BMP-7, als am besten untersuchte Cytokine bereits in rekombinanter (*recombinant human*, rh) Form in klinischer Anwendung sind. Während rhBMP-2 die mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung veranlasst, scheint rhBMP-7 auf reifere Knochenvorläuferzellen zu wirken (Valderrabano et al. 2009). Mehrere Studien haben gezeigt, dass weitere BMP's (4, 6, 9) eine hohe osteoinduktive Potenz besitzen und unterschiedliche Rezeptoren an den knochenbildenden Zellen aktivieren (Murata et al. 1999; Deckers et al. 2002; Elliot Carlisle und Fischgrund 2005; Giannoudis und Einhorn 2009; Cui et al. 2013).

Es herrscht keine Einigkeit über die verwendbaren Konzentrationen zur besseren Knochenregeneration. Sie schwanken zwischen 0,1 µg und 100 mg in Tierversuchen (Gothard et al. 2014). Außerdem inhibieren die BMP's die Reifung von Osteoklasten in dem sie die Produktion von Osteoprotegerin auf den Osteoblasten stimulieren und das Osteoprotegerin die Differenzierungsfaktoren für Osteoklasten bindet (Wan et al. 2001). Trotz der Fortschritte im Verstehen der Aktivität und Effektivität der BMP's bleiben viele Fragen unbeantwortet (Cui et al. 2013).

1.6 Trägersysteme für Wachstumsfaktoren

Die Anwendung von Wachstumsfaktoren in der regenerativen Medizin erfordert nicht nur beste strukturelle und mechanische Eigenschaften der Trägermaterialien, sondern auch die Möglichkeit Wachstumsfaktoren an den Träger zu binden und möglichst kontrolliert bzw. verzögert freizusetzen (Schliephake 2010).

Ein adäquates Trägersystem muss neben biologischer Nachahmungsfähigkeit, biologisch abbaubar, biokompatibel und mechanisch stabil sein. Im besten Fall sollte das Trägermaterial ohne das Hervorrufen einer immunologischen Reaktion während der Gewebsintegration und ohne Entstehung von toxischen Abbauprodukten die dreidimensionale Struktur des Wirtsgewebes kopieren. Biomechanisch spielt bei der Herstellung eines Idealen Trägermaterials die Elastizität, Zerreißfestigkeit und Thermostabilität eine wichtige Rolle (Gothard et al. 2014).

Es werden anorganische und organische Trägersysteme unterschieden. Die anorganischen Träger können auf Metall (Titanimplantate) oder Mineral (Knochenersatzmaterialien) basierend sein. Wobei die Bedingungen und die Temperaturen während des Herstellungsprozesses lediglich eine Oberflächenkopplung der Wachstumsfaktoren erlauben. Die organischen Trägermaterialien sind natürlichen oder synthetischen Ursprungs. Sie bieten auf Grund variabler Abbaueigenschaften und chemischer Modifikationen ein höheres Potenzial zu unterschiedlichen Bindung von Wachstumsfaktoren. Neben Seide und Chitosan hat das Kollagen als Vertreter der natürlichen organischen Trägermaterialien als Einziger die Zulassung zur klinischen Anwendung in Verbindung mit BMP. Zu den synthetischen organischen Trägerstoffen zählen die Polymere von Poly- α -Hydroxysäuren mit Polymilchsäure (Polylaktid) und Polyglykolsäure. In zahlreichen präklinischen Studien konnte

vielversprechende kontrollierte bzw. verzögerte Wachstumsfaktorfreisetzung gezeigt werden, welche klinische Umsetzung erfordert (Schliephake 2010).

Eine Vielzahl von Materialien wurde entwickelt um idealerweise die extrazelluläre Matrix mit ihren Einfluss auf die Knochenregeneration zu imitieren oder zu inkorporieren. Dies bedeutet, dass ein erfolgreiches Trägersystem stadiengerechte Freigabe von angiogenen und osteogenen Faktoren enthält und dieses in physiologischer Reihenfolge abläuft (Bayer et al. 2015).

Die synthetisch hergestellten Träger können im Gegensatz zu biologischen Trägersystemen ein erhöhtes Maß an Materialeigenschaftenkontrolle aufweisen. Vor allem Polymere, die durch Begasung, Gießen und Vernetzung hergestellt werden, können durch Kombination unterschiedlicher Zerfallseigenschaften unterschiedliche Freigabeprofile erfüllen (Bayer et al. 2015). So hat die Gruppe um Kanczler 2010 ein signifikant erhöhtes enchondrales Wachstum in Knochendefekten durch die Kombination von schnell degradierbaren Alginat mit VEGF und verzögerter Freigabe von BMP-2 aus Polylaktid in einem durch superkritische Begasung entstandenen Trägern festgestellt (Kanczler et al. 2010). Andere Autoren nutzten die Durchmischung von unterschiedlich degradierbaren, mit Wachstumsfaktoren beladenen Polymermikropartikeln und erreichten eine zeitversetzte Faktorenfreisetzung bei besserer Kalzifizierung in vitro (Richardson et al. 2001; Basmanav et al. 2008). Andererseits ist festgestellt worden, dass beim alleinigen Einsatz von Polymeren als Trägermaterial wichtige Trägereigenschaften, wie Osteokonduktivität und strukturelle Integrität beeinträchtigt werden. Das Kalziumphosphat erfüllt die Eigenschaft der Osteokonduktivität und kann mit inkorporierten, wachstumsfaktorbeladenen Polymermikropartikeln druckfestes, biologisch abbaubares Trägermaterial sein (Bayer et al. 2015).

Eine andere Methode zur kontrollierten Wachstumsfaktorfreisetzung ist die Herstellung von Trägersystemen, die aus unterschiedlich degradierbaren und mit Faktoren beladenen Kernmaterial und Schalenmaterial bestehen. Dabei ist die Freisetzung der im Kern enthaltenen Wachstumsfaktoren von den Zerfalls- und Diffusionseigenschaften des Schalenmaterials abhängig (Perez und Kim 2015).

Das nächste Konzept zur Herstellung von synthetischen Trägersystemen beruht auf der Schichtung von Gerüstmaterialien mit unterschiedlichen Härtungseigenschaften, die durch das Aushärten jeder Schicht vor dem Einbringen der nächsten und durch die unterschiedliche Vernetzung ermöglicht wird. Dabei besteht der Unterschied zu Kern-Schalen-Gerüsten in der Verwendung von mehr als zwei nebeneinander liegenden Trägermaterialien und der Beschichtung eines nicht mit den Faktoren beladenen Kernmaterials. Mögliche Nachteile dieses Gerüstmodells können bei der Herstellung von zu dicken Schichten eine fehlende Interaktion zwischen den jeweiligen Wachstumsfaktoren für Knochen-/Gefäßneubildung und eine vorzeitige Freisetzung bei fehlender Barriere sein. Der einzigartige Vorteil des Schichtgerüsts besteht in der Herstellung von dünneren Trägern, die als Mantel für andere Materialien dienen können (Bayer et al. 2015).

Die Herstellung von biologischen Trägergerüsten stellt eine Alternative zu synthetischen Materialien dar. Dazu gehört zum Beispiel autolog oder allogenen hergestellter plättchenreicher Plasma (*platelet-rich plasma*)-Träger, welcher bereits mehrere wichtige

angiogene und osteogene Wachstumsfaktoren enthält, jedoch auf Grund fehlender mechanischer Stabilität mit anderen stabilen Trägern kombiniert werden muss. Dabei ist die Kontrolle über die Wachstumsfaktorenfreisetzung und die enthaltene Konzentration der Faktoren in den hergestellten Trägern schwer steuerbar. Eine andere Alternative sind gentechnisch hergestellte Träger, bei denen viral und nicht viral hergestellte Wachstumsfaktorgene kodiert und in ein Gerüst eingebaut werden. Sie bieten neben anhaltender lokaler Wachstumsfaktorexpression durch den Einbau von Promotoren ein hohes Maß an Freisetzungskontrolle. Jedoch ist die Gentechnik in der klinischen Anwendung auf Grund von Sicherheitsbedenken nur begrenzt umsetzbar (Bayer et al. 2015). Die dritte Technik zur Herstellung von biologischen Trägern beruht auf der Verwendung von kleinen Molekülen, die eine Masse unter 1000 Dalton haben und zu klein sind um eine unerwünschte immunologische Reaktion hervorzurufen. Neben der hohen thermischen Stabilität benötigt es keine strukturelle Integrität höherer Ordnung. Die größte Herausforderung bei diesem Trägersystem besteht in der Kontrolle über zeitliche und räumliche Wirkung der Kleinstmoleküle um unerwünschte Wirkung in anderen Geweben zu verhindern (Laurencin et al. 2014).

1.7 Freisetzungsphysiologie von Wachstumsfaktoren

Die Untersuchungen der Einzelapplikation von Wachstumsfaktoren vor allem des BMP-2 sind umfangreich und zeigen uns, dass dieser auf zellulärer Ebene nicht nur wichtiger Auslöser für die Osteoblastenproliferation ist, sondern auch zur Differenzierung von osteoblastären mesenchymalen Stammzellen führt. Die Untersuchungen in menschlichen Körper führen in den meisten Fällen zur Induktion von mineralisiertem Gewebe, jedoch gibt es große Unterschiede im Erfolg der humanen Reaktion auf die BMP-Applikation. Diese Unterschiede können durch die Desorption von Proteinen bei fehlenden Diffusionshindernissen erklärt werden. Ein weiterer limitierender Faktor stellt die Gefäßnetzbildung durch die alleinige BMP-2 Applikation dar. Die daraufhin untersuchten angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF in Einzelapplikation führten zur keiner signifikant erhöhten Knochenbildung in ekto- oder orthotop implantierten Trägern. (Bayer et al. 2015).

Für die erfolgreiche Unterstützung der Knochenregeneration durch Wachstumsfaktoren ist die Freisetzung mit abnehmender Geschwindigkeit, sog. *slow release* von angiogenen, osteogenen und chondrogenen Faktoren entscheidend (Gothard et al. 2014). Um die rasche Diffusion und Absorption der Wachstumsfaktoren nach der Applikation zu verhindern werden diese auf Trägermaterialien appliziert und können somit durch kontrollierte Freisetzung die physiologische Geweberegeneration am besten unterstützen (Takaoka et al. 1991).

Die Kombination von BMP und VEGF hat abhängig von deren Konzentrationen einen synergistischen Effekt auf Knochenbildung und Knochenheilung. Im Gegensatz zur Einzelapplikation steigert die Kombination der Wachstumsfaktoren die Knochenregeneration in *Critical-size*-Defekten. Sehr hohe Dosen von VEGF und VEGF/BMP-Kombination In-vivo-

und In-vitro-Studien haben einen negativen Effekt auf die Mineralisierung (Cui et al. 2013). Dies lässt vermuten, dass die Steigerung der Knochenheilungsrate durch VEGF-Zugabe nicht nur die Angiogenese und Vaskulogenese beeinflusst, sondern einen direkten Effekt auf die Stammzellen und deren Differenzierung hat (Li et al. 2009). Der synergistische Effekt der Wachstumsfaktorkombinationen ist abhängig von der zeitlichen Freisetzung aus dem Trägermaterial und der verwendeten Dosis (Kempen et al. 2010). Bayer und Kollegen stellten in ihrer zusammenfassenden Arbeit fest, dass zwar anfänglich die Gewebevermehrung durch duale Freisetzung von angiogenen und osteogenen Faktoren in den meisten Studien nachweisbar ist, dies jedoch nicht immer zur langfristig signifikanten Verbesserung im Gegensatz zur BMP-Einzelapplikation führt. Diese Ergebnisse deuten einerseits auf noch nicht in Gänze verstandenen Interaktionen zwischen Vielzahl der Zelltypen andererseits zu welchen Zeitpunkten die jeweiligen Faktoren im natürlichen Knochenheilungsprozess präsentiert werden (Bayer et al. 2015).

Nachwievor herrscht keine Einigkeit über die ideale Wachstumsfaktorapplikation auf den Trägermaterialien und über die verwendbaren Konzentrationen der Wachstumsfaktoren (Schliephake et al. 2007).

Es gibt Versuche Polylaktid-Träger durch Begasung mit Wachstumsfaktoren zu beimpfen. Dabei werden Wachstumsfaktoren durch Kohlendioxid-Hochdruckverfahren in das Trägermaterial eingebracht (Tschakaloff et al. 1996).

Andere versuchen die Wachstumsfaktoren in die Poren des Trägermaterials zu saugen, um eine verzögerte Freisetzung aus dem Material zu ermöglichen. Dies führte jedoch zu einer schnellen Entladung und einer kurzen osteoinduktiven Wirksamkeit von 48 Stunden (Kanematsu et al. 2004). In weiteren Versuchen konnte durch die Begasung von Trägermaterialien die Freisetzung von Wachstumsfaktoren abhängig von der Konzentration bis zum 27. Tag erfolgen (Schliephake et al. 2007).

1.8 Fazit und Zielsetzung der Arbeit

Die Versorgung knöcherner Defekte, die durch Traumata, Fehlbildungen und Tumore entstanden sind stellt im klinischen Alltag eine große Herausforderung dar. Trotz neuer Therapieansätze zur Behandlung von *Critical-size*-Defekten ist keines der aktuell im klinischen Alltag verwendeten Knochenersatzmaterialien in der Lage alle geforderten Eigenschaften vollständig zu erfüllen (Egol et al. 2015).

Neue Ansätze zur Verbesserung der Knochenregeneration durch die Kombination der Wachstumsfaktoren BMP und VEGF konnten eine Steigerung der Differenzierung und des Wachstums von osteogenen Zellen auf Trägermaterialien zeigen (Xiao et al. 2011). Es ist jedoch wichtig die Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus dem Trägermaterial kontrolliert, im Sinne eines *slow release*, zu gestalten, da die langanhaltende Verfügbarkeit für den klinischen Effekt entscheidend ist (Schliephake et al. 2007). Es gibt keine Einigkeit über die notwendigen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren für den bestmöglichen Knochenregenerationseffekt (Gothard et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir uns mit der Möglichkeit zur Verbesserung der Knochenregeneration in vivo durch den Einsatz der Kombinationen von VEGF und BMP in unterschiedlichen Dosierungen aus den Polylaktid/Kalziumkarbonat(PDLLA/CaCO₃)-Komposit-Scaffolds beschäftigt. Die neu gebildete Knochenmasse wurde mit dentalen Volumetomographien (DVT) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Implantatherstellung

2.1.1 Wachstumsfaktoren

In dieser Studie verwendeten wir den rekombinanten humanen Wachstumsfaktor BMP (rhBMP-2, RELIAtech GmbH, Wolfenbüttel), der mittels Escherichia-coli-Bakterienkultur gewonnen wurde (Vallejo et al. 2002). Die Wirksamkeit des rhBMP-2 wurde bereits Ende der 90er Jahre nachgewiesen (Murata et al. 1999). VEGF verwendeten wir ebenfalls in rekombinanter Form, mittels Escherichia coli-Bakterienkultur gewonnen (rhVEGF-165, RELIAtech GmbH, Wolfenbüttel) und auch hier gibt es eine nachgewiesene Wirksamkeit (Drake et al. 2006).

2.1.2 Implantat

Das Implantat wurde als Komposit-Scaffold aus vier Teilen Poly(D, L)-Laktid (PDLLA) und einem Teil Kalziumkarbonat (CaCO_3) hergestellt. Das Trägermaterial wurde in wässriger Lösung angesetzt, mit Rotorschüttler durchmischt und bei -70°C eingefroren. Danach erfolgten die Schockgefrierung mittels Stickstoff und die Gefriertrocknung über Nacht. Die Lyophilisierung wurde bei -15°C bis -20°C in einer Vakuumkammer und bei -85°C in einem Eiskondensator über acht Stunden durchgeführt (Fa. Christ Alpha 2-4, Osterode am Harz). Das Lyophilisat wurde in 8x3 mm Polytetrafluorethylen (PEF) Hohlformen eingebracht. Die Kohlendioxidbegasung der Scaffolds erfolgte durch KLS-Martin (Fa. KLS-Marin, Tuttlingen) bei 37°C und 76,1 bar über zwei Stunden. Präoperativ erfolgte die Verkleinerung der nativen Scaffolds mittels einer Lochstanze auf 5 mm Durchmesser (Abbildung 4).

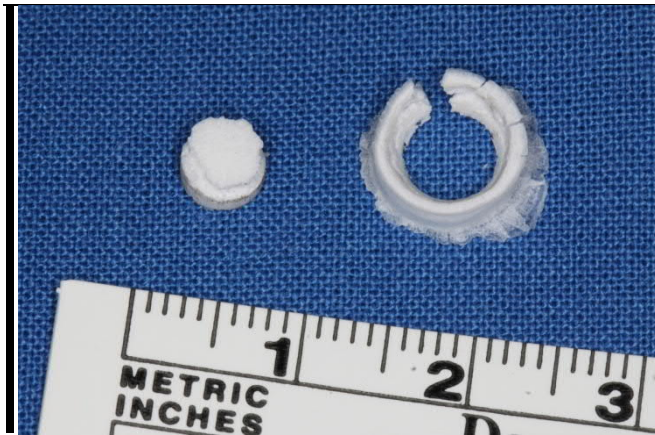


Abbildung 4: Das fertige Scaffold nach Größenanpassung mit der Lochstanze

2.2 Versuchstiere und Tierhaltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten verwendet (*Rattus norvegicus*, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld; Tierversuchsgenehmigungsnummer: 33.9-42502-04-10/0223). Die Haltung und Behandlung der Tiere erfolgte über den Versuchszeitraum im zentralen Tierlabor der Georg-August-Universität Göttingen. Die Versuchstiere wurden in Macralon-Käfigen Typ IV (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co. KG, Emmendingen) untergebracht, welche als Einstreu Holzfasern-Granulat (Linguacel® Select, L. Rettenmaier, Wilburgstetten) hatten. Der Wechsel der Einstreu wurde wöchentlich durchgeführt.

Die Ratten waren am Operationstag drei bis sechs Monate alt und 300 bis 600 Gramm schwer. Präoperativ wurden je fünf Tiere pro Käfig gehalten, postoperativ drei Tiere pro Käfig. Die Ratten hatten einen Hell-Dunkel-Wechsel von 12 Stunden, die Raumtemperatur betrug 20-24°C bei einer Raumluftfeuchte von 50-60%. Die Fütterung erfolgte mit Nagerfutter (Ssniff Haltungsfutter, 10mm Pellets, ad libitum) und Leitungswasser.

2.3 Einteilung und Größe der Tiergruppen

In jede Gruppe wurden 18 Tiere, zu je 6 Tieren für 2 Zeitpunkte 4 und 13 Wochen eingeordnet.

Tabelle 1: Einteilung der Versuchstiergruppen

Einzel dosierung	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Untergruppe A 4 Wochen	Blank +24µg BMP	Blank +48µg BMP	Blank +96µg BMP	Blank+0,24 µg VEGF	Blank+1,5 µg VEGF	Blank+6µg VEGF
Untergruppe B 13 Wochen	Blank +24µg BMP	Blank +48µg BMP	Blank +96µg BMP	Blank+0,24 µg VEGF	Blank+1,5 µg VEGF	Blank+6µg VEGF

Kombinationen	Gruppe 7	Gruppe 8	Gruppe 9	Gruppe 10	Gruppe 11
Untergruppe A 4 Wochen	Blank +1,5µg VEGF +24µg BMP	Blank +6µg VEGF +24µg BMP	Blank +1,5µg VEGF +48µg BMP	Blank +6µg VEGF +48µg BMP	Leer
Untergruppe B 13 Wochen	Blank +1,5µg VEGF +24µg BMP	Blank +6µg VEGF +24µg BMP	Blank +1,5µg VEGF +48µg BMP	Blank +6µg VEGF +48µg BMP	Leer

2.4 Operatives Vorgehen

Die Operationen an den Versuchstieren wurden allesamt im Operationssaal der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.4.1 Narkose

Nach der Feststellung des Ausgangsgewichts wurden die Tiere mit Medetomin (Domitor[®], 60µg/kg Körpergewicht) und Ketamin (Ketavet[®], 14mg/kg Körpergewicht) über einen rechtsseitigen intraperitonealen Zugang mit Tiefenstop narkotisiert. Durch das Setzen eines Schmerzreizes im Interdigitalraum erfolgte die Überprüfung der Narkosetiefe. Die Augen wurden mit Bepanthen-Augensalbe abgedeckt.

2.4.2 Operation

Nach Rasur, Reinigung und Desinfektion des Operationsgebietes wurden die Ratten auf der Seite gelagert. Um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden wurden Wärmekissen verwendet. Die Schmerzreduktion erfolgte durch subkutane präoperative Injektion mit Buprenorphin (Temgesic[®], 0,05 mg/kg Körpergewicht). Die Operationsdauer betrug für jedes Tier etwa 45 Minuten.

Zur Darstellung des Unterkiefers wurde ca. 1 cm langer submandibulärer Hautschnitt (Abbildung 5a) durchgeführt. Nach der Präparation durch den Musculus masseter unter Schonung der nervalen Strukturen und des Ausführungsganges der Glandula parotis wurde das Weichgewebe lingual und bukkal vom Unterkieferrand mittels eines Raspatoriums abgelöst sowie das Gewebe nach oben mobilisiert. Anschließend wurde im Bereich des Processus angularis ein standardisierter *Critical-size*-Defekt von 5mm im Durchmesser, bikortikal im Bereich des aufsteigenden Unterkieferastes unter strenger Aussparung der Nervenbahn gesetzt (Abbildung 5b).

In den Gruppen 1-10 wurde auf einer Unterkieferseite ein PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffold nach dem Auftropfen der entsprechenden Wachstumsfaktordosis im *press-fit*-Verfahren eingesetzt. Nachfolgend verschloss man die Wunden mehrschichtig mit Vicryl der Stärke 4.

In Gruppe 11 wurde auf einer Seite ein PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffold ohne Medikamentenzusatz mit *Press-fit*-Verfahren eingebracht (Abbildung 5c). Auf der Gegenseite wurde der Defekt ohne weitere Therapie belassen. Hier erfolgte ebenfalls der mehrschichtige Wundverschluss mit Vicryl der Stärke 4.

Zur Identifikation der Tiere wurde ein Transponder im Nackenbereich implantiert. Postoperativ erfolgte die Gabe von Buprenorphin (Temgesic[®], 0,05 mg/kg Körpergewicht) und die Teilantagonisierung durch Atipamezol (Antisedan[®], 2mg/kg Körpergewicht s.c.). Bis zum Abklingen der Narkose wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen gehalten.



a)



b)



c)

Abbildung 5: Ratte intraoperativ: a) submandibulärer Hautschnitt, b) Unterkieferknochen mit *Critical-size*-Defekt von 5mm, c) Implantat in situ

2.5 Postoperatives Vorgehen

Neben den regelmäßigen klinischen Kontrollen und der Überwachung des Gesundheitszustandes der Tiere wurden Analgetika nach festgelegtem Schema verabreicht. Bis zum zweiten postoperativen Tag erfolgte zwei Mal täglich die Gabe von Temgesic (0,05-0,02 mg/kg Körpergewicht s.c.). Ab dem dritten postoperativen Tag wurde die Analgesie auf Carprofen (Rimadyl[®], 5 mg/kg Körpergewicht s.c.) 1-0-0 reduziert. Das Trinkwasser wurde mit Metamizol (Metapyrin[®], 3ml/ 1 Liter Trinkwasser) bis zum 14. postoperativen Tag angereichert. Bei Anzeichen von Schmerzen verlängerte man die Medikamentengabe. Starke Infektionen im Bereich der Polymerträger und/oder Kieferbruch der Versuchstiere galten als Abbruchkriterien.

2.6 Versuchsbeendigung

Die Euthanasie der Tiere nach Ablauf der Beobachtungszeiträume erfolgte durch CO₂-Applikation in einem abgeschlossenen Raum. Durch die Inhalation des Gases wurden die Tiere innerhalb weniger Sekunden bewusstlos und erlitten nach ca. einer Minute einen Herz-Kreislaufstillstand. Nach Todesfeststellung wurden die Unterkiefer entnommen und der weiteren Aufbereitung zugeführt (Abbildungen 6a und 6b).

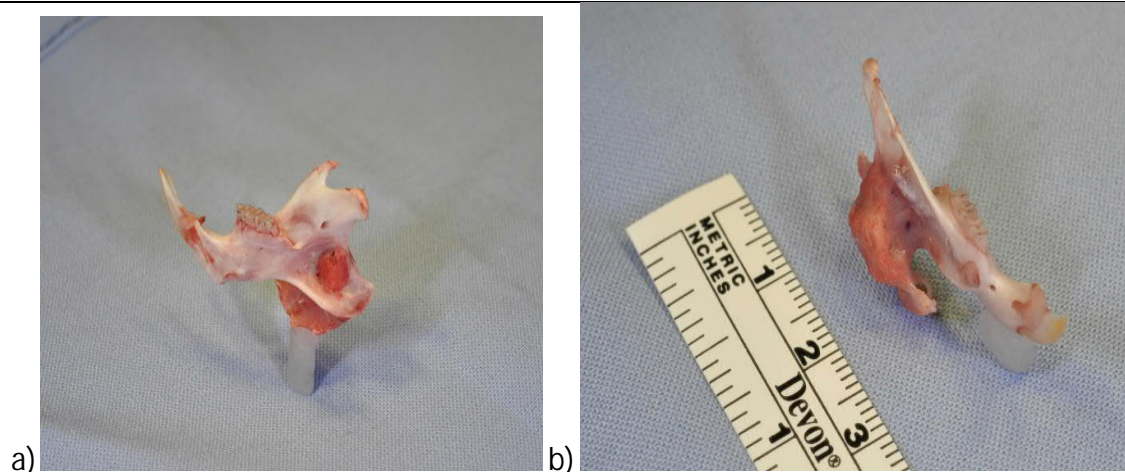


Abbildung 6: Unterkieferpräparate mit deutlichen Knochenzuwachs lateral, a) Ansicht von distomedial, b) Ansicht von ventrolateral

2.7 Aufbereitung der Präparate

Die Bearbeitung der Präparate wurde im Labor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Die radiologische Bildgebung erfolgte mit einem digitalen Volumentomographen (PaX-Zenith 3D/ Vatech/ Republic of Korea(Hwaseong)). Nach der Entnahme der Unterkieferpräparate wurden diese zunächst in 4% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Durch die Applikation von Ethanol in aufsteigender Konzentration erfolgte der Wasserentzug (Dehydratation). Die Unterkieferpräparate wurden in Technovit 9100 (Haereus Kulzer, Wehrheim) eingebettet und nach Aushärtung im digitalen Volumentomographen gescannt.

2.8 Digitale Volumentomographie

Im Jahr 2000 wurde, der schon 1997 entwickelte und drei Jahre lang erprobte Tomograph unter den Namen *3DX multi-image micro-CT* auf den Markt gebracht (Hashimoto et al. 2003). Im Gegensatz zur Schichtabtastung der konventionellen Computertomographie (CT) wird in der digitalen Volumentomographie (DVT, angloamerikanisch *cone beam-CT*) der 3D-Datensatz in nur einem Umlauf mit Hilfe eines kegelförmigen Strahlenbündels aus vielen zweidimensionalen Bildern gewonnen. Anschließend erfolgt die 3D-Rekonstruktion am Computer, welche eine gute Bildqualität der Hartgewebsstrukturen ermöglicht (Terakado et al. 2000).

2.9 Herstellung der DVTs

Im DVT richtete sich die Anzahl der gescannten Kiefer nach deren Größe. Das *field of view* (FOV) betrug 50x50 mm und die Voxelgröße 80 μm . Die Exposition fand bei 120 kV und 8 mA statt. Das Tomogramm wurde an axialen Scans senkrecht zum Defekt und parallel zum unteren Rand des Unterkiefers durchgeführt. Die Daten wurden im DICOM-Format importiert und mittels digitalen Programms (Fiji/ Fiji is just ImageJ/ Johannes Schindelin, Albert Cardona, Mark Longair, Benjamin Schmid und andere/ Madison / 7 March 2011) nach dem gleichen Schema ausgewertet.

2.10 Auswertung mit digitalen Programm

Nach der Durchführung des DVTs konnte man den neu gebildeten Knochen von ortsständigen Knochen unterscheiden. Die Schwellenwerte für das Zählen von Pixeln der Implantatregion wurden für jedes Bild unter visueller Kontrolle angepasst (Schindelin et al. 2012). Die Pixelgröße betrug 0,016 mm², die Ergebnisse wurden in mm² ausgedrückt und der Prozentsatz des neu gebildeten Knochens im Verhältnis zur Gesamtfläche ermittelt.

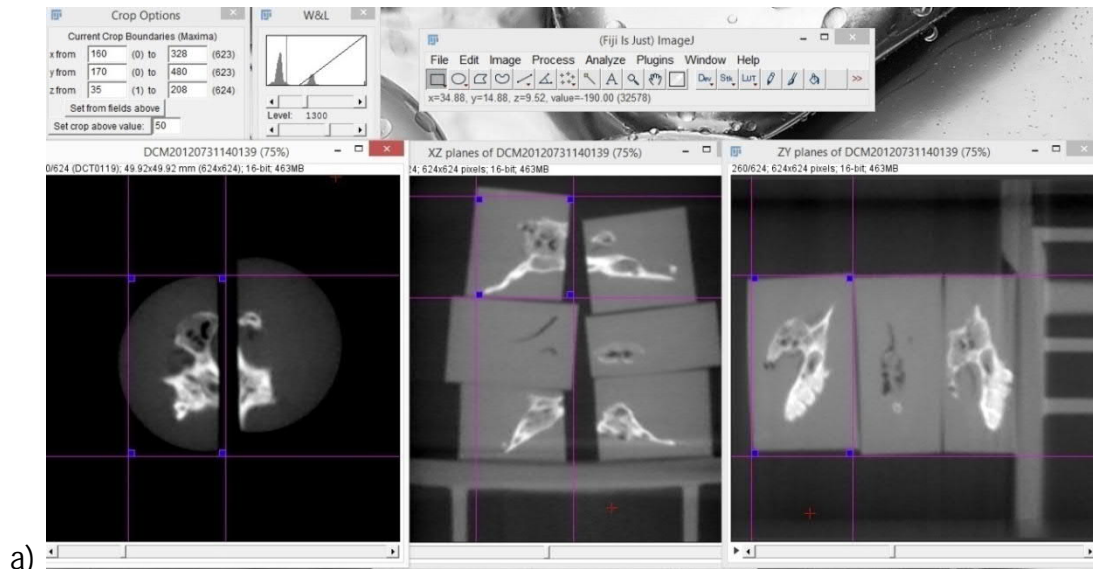
2.10.1 Isolation Einzelkiefer

Nach dem Importieren des ausgewählten DVT wurde zunächst über den Menüpunkt Crop 3D XY-, XZ- und YZ-Ebene errechnet und in der jeweiligen Ebene die dargestellten Blöcke eingestellt. Der gewünschte Kiefer musste isoliert und mit Schnittlinien eingegrenzt werden (Abbildung 7a). Es folgte das Herausschneiden der Bildsequenz des eingegrenzten Kiefers und das Auswählen von *Crop*-Menüpunkt (Abbildung 7b). Der Unterkiefer wurde über *Plugins, Transform* und *Interactive Stack Rotation* so lange gedreht bis das Defektareal orthograd getroffen war und somit senkrecht zur Schnittebene lag (Abbildung 7c). Der so entstandene Datensatzes konnte als TIFF.file gespeichert werden.

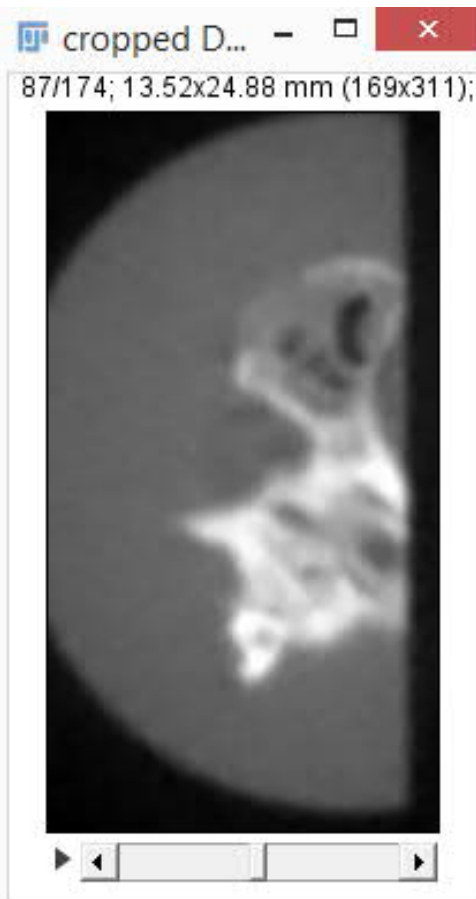
2.10.2 Analyse

Zur Analyse des bearbeiteten DVT wurde eine Schicht mit dem größten Durchmesser der Knochenmasse ausgewählt und diese mit *Duplicate* herausgeschnitten. Der in dieser Schicht entstandene Knochen mit ggf. noch vorhandenen Defekt konnte mit Polygonfunktion umfahren und mit *Clear outside* herausgeschnitten werden (Abbildung 7d). Im entstandenen Polygon wurden über *Image/Adjust/Threshold* Grauwerte für Knochen eingestellt und gemessen (Abbildung 7e). Am Ende konnte die Gesamtfläche dieser Schicht und neu entstandene Knochenfläche der jeweiligen Schicht in mm² durch das Programm bestimmt

und prozentualer Anteil des neu entstandenen Knochens von dieser gesamten Schicht durch das Programm errechnet werden (Knochendichte in %).



a)



b)



c)

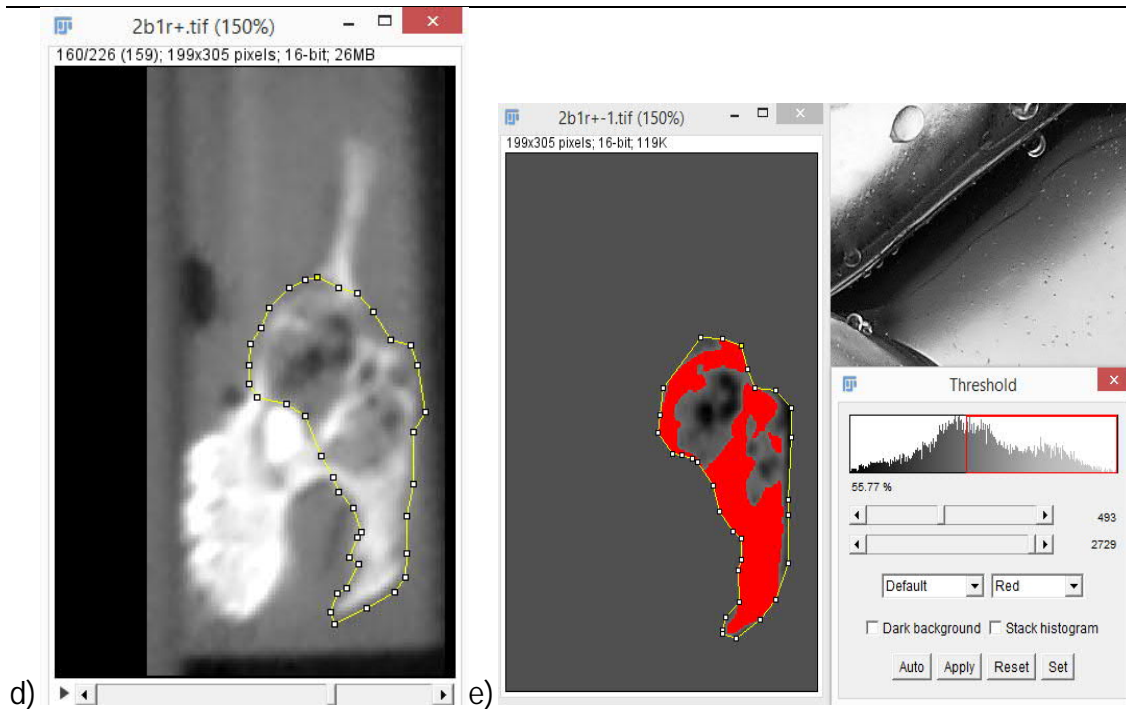


Abbildung 7: Digitale Bearbeitung des DVT a) Darstellen des gewünschten Kiefers; b) herausgeschnittener Rattenkiefer; c) orthograde Darstellung; d) Auswählen des neu entstandenen Knochens; e) Messen der Grauwerte

2.11 Statistische Methoden

Die statistische Aufbereitung der Ergebnisse wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen (Prof. Dr. Tim Friede) durchgeführt.

Bei einer nicht normalverteilten Datenlage der Versuchsergebnisse, erfolgte die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse mittels nichtparametrischer Varianzanalyse (ANOVA) um den Einfluss von Implantat, Zeit sowie deren Wechselwirkung zu beurteilen.

Zusätzlich wurden arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Post-hoc-Tests zum Vergleich der Mittelwerte wurden durch den Mann-Whitney-U-Test mit dem Bonferroni-Holm-Verfahren und Sidaks-Vergleichstest zur Erstellung von Signifikanzwerten durchgeführt (siehe Tabellen im Anhang).

Der Signifikanzlevel lag bei allen durchgeführten Tests bei 5 %. Für die Ermittlung der Varianzanalyse wurde das Statistikprogramm R (Version 3.1.2, www.r-project.org) und Statistikprogramm Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA 92108) verwendet. Für die tabellarische Darstellung verwendeten wir das Excel-Programm von Microsoft Office 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Knochendichte

Die Abbildung 8 zeigt beispielhaft die radiomorphometrische Analyse der Knochenregeneration der Rattenkiefer zu den Zeitpunkten 4 Wochen und 13 Wochen. Es fand zunächst die Knochenneubildung am Implantatrand statt und im weiteren Verlauf konnte die Knochenapposition nach bukkal beobachtet werden. Wobei das Implantat teilweise resorbiert und durch Knochen ersetzt wurde.

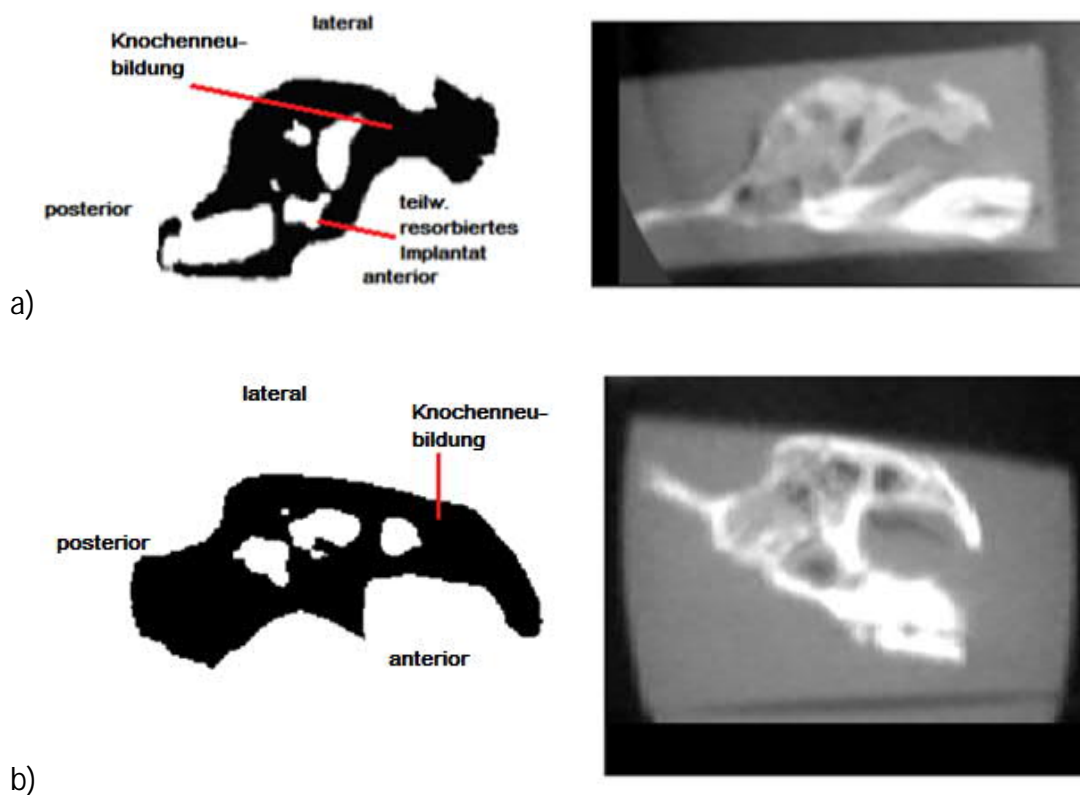


Abbildung 8: Radiomorphometrische Analyse

- a) Applikationsgruppe 4 Wochen mit Darstellung des neu gebildeten Knochenvolumens
 b) Applikationsgruppe 13 Wochen mit bukkaler Knochenapposition und Zunahme des Knochenvolumens

3.1.1 BMP

Bei der Analyse der Einzeldosierungen über die Zeit von 4 Wochen und 13 Wochen ergab sich kein signifikanter Unterschied der Knochendichte in den jeweiligen topisch applizierten

BMP-Dosierungen von 24 μg , 48 μg und 96 μg . Im Vergleich zu BMP-Gruppen zeigte Kontrollgruppe (Blank) signifikant verminderte Knochendichte (Abbildung 9).

Bei der Betrachtung der Abhängigkeit der Dosierungen zu den beiden Zeitpunkten 4 Wochen und 13 Wochen ließ sich eine Steigerung der Knochendichte nur in den 4-Wochen-Gruppen erkennen. Die Knochendichte der 96 μg BMP-Gruppen war nach 4 Wochen im Vergleich zu beiden anderen Gruppen signifikant hoch (Abbildung 9).

In den 13-Wochen-Gruppen unterscheiden sich die Dosisgruppen mit 24 μg BMP und 48 μg BMP in der Knochendichte nicht voneinander.

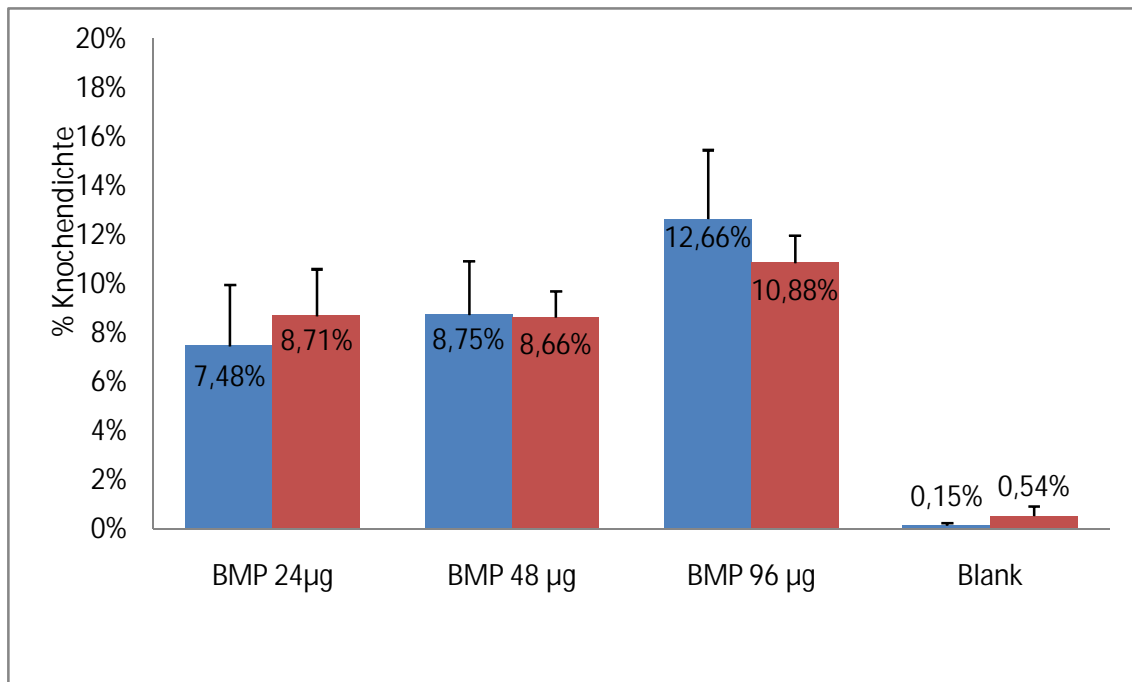


Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte der BMP-Einzeldosierungen und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$

3.1.2 VEGF

Die radiomorphometrische Betrachtung der Knochendichte bei der lokalen Applikation der VEGF-Einzeldosierungen von 0,24 μg , 1,5 μg über 6 μg zeigte zu den Zeitpunkten 4 Wochen und 13 Wochen keinen signifikanten Unterschied. Der Vergleich Kontrollgruppe/VEGF-Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 10).

Die Auswertung der Einzeldosierungen von VEGF zu den Zeitpunkten 4 Wochen und 13 Wochen ergab eine deutlich geringere Knochendichte als die mit BMP und BMP/VEGF-Kombinationen beladenen Implantate. Die höchste Knochendichte wies die Gruppe mit 6 μg nach 4 Wochen auf (Abbildung 10).

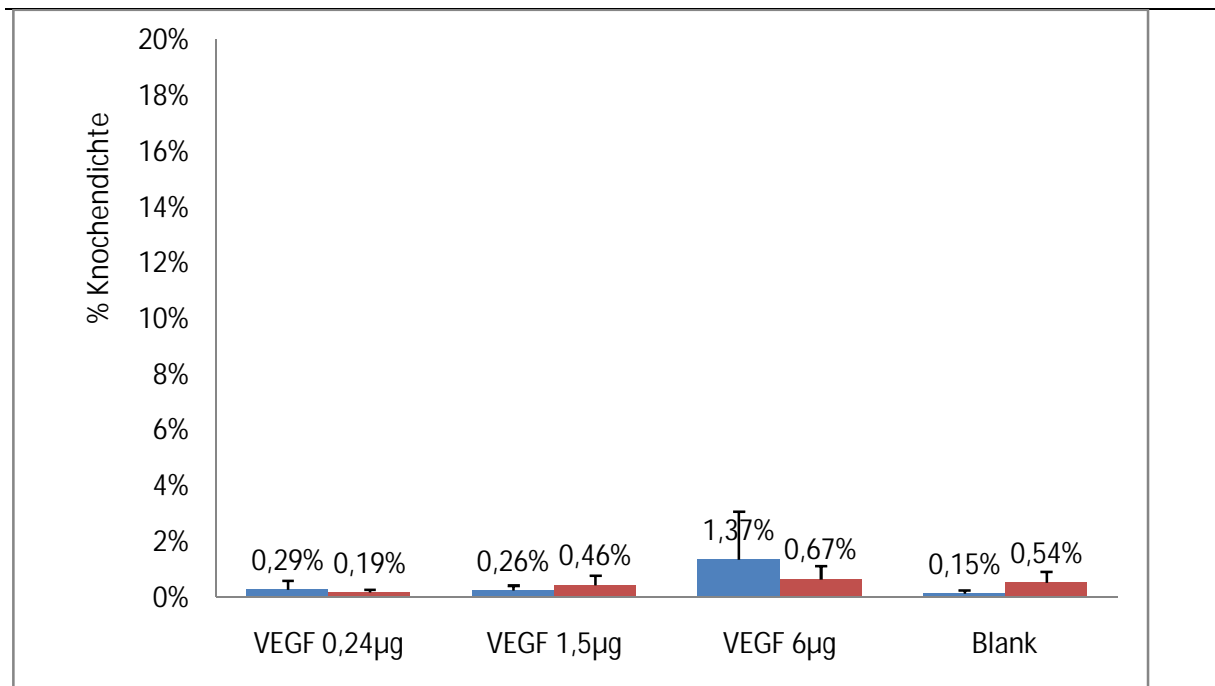


Abbildung 10: Vergleich der Mittelwerte der VEGF-Einzeldosierungen und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$

3.1.3 Kombination BMP/VEGF

Die Auswertung des Einflusses der Zeit auf die Knochendichte bei den Kombinationsdosierungen des VEGF und BMP von 1,5 µg/6 µg und 24 µg/48 µg ausgenommen Kombination 1,5 µg/24 µg ergab keinen signifikant relevanten Unterschied. Die Kontrollgruppe zeigte eine signifikant geringere Knochendichte (Abbildung 11).

Die Auswertung der erfassten Knochendichten bei den mit VEGF und BMP beladenen Implantaten ergab eine Steigerung der Knochendichte mit der steigenden BMP-Konzentration. Vor allem in den 4-Wochen-Gruppen war der Effekt deutlich sichtbar. Dabei wies die Kombination 6 µg VEGF mit 48 µg BMP die höchste Knochendichte auf. Im Verlauf der 4. bis hin zur 13. Woche hatte die Gruppe mit Kombination 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP die größte Zunahme der Knochenneubildung. Andererseits zeigte die Gruppe 6 µg VEGF mit 48 µg BMP eine Abnahme der Knochenneubildung in der 13-Wochen-Gruppe. In den beiden anderen Kombinationsgruppen 1,5 µg VEGF mit 48 µg BMP und 6 µg VEGF mit 24 µg BMP ließ sich kein Trend in der Knochenneubildungsrate erkennen (Abbildung 11).

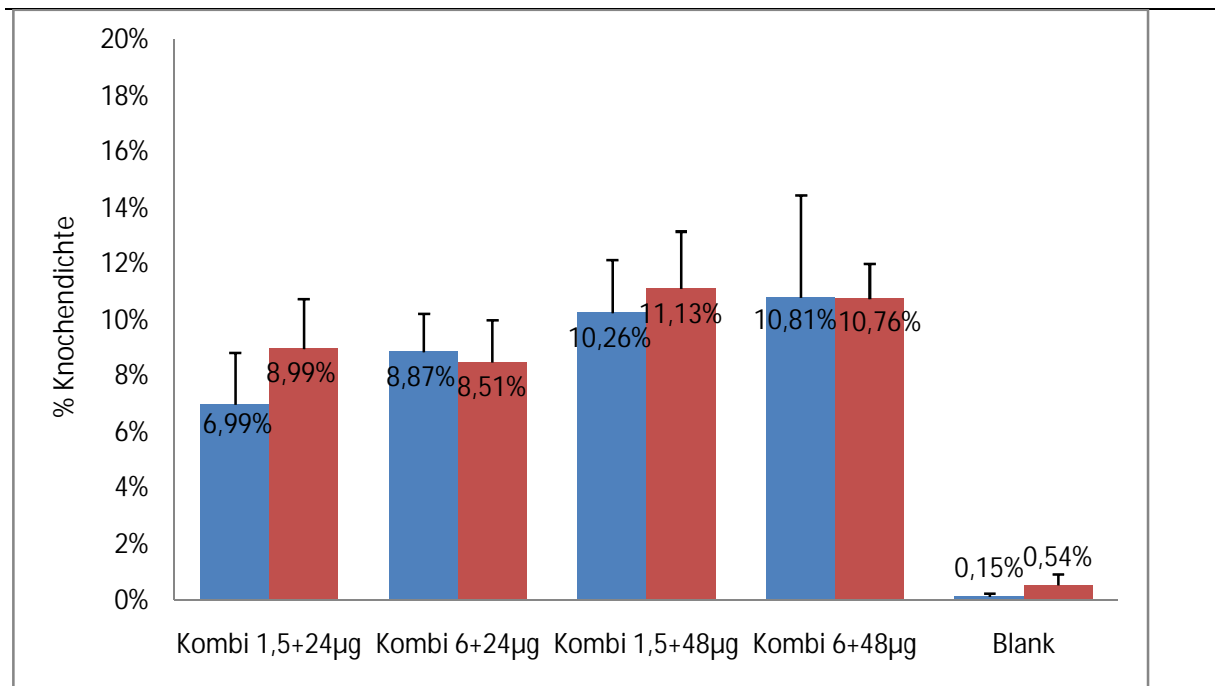


Abbildung 11: Vergleich der Mittelwerte der Kombinationsdosierungen VEGF+BMP und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$

3.1.4 Vergleich der Knochendichte der Einzeldosierungen von BMP und Kombinationen VEGF/BMP

Beim Vergleich der Kombinationsgruppen und der BMP-Gruppen wurden die beiden Zeitpunkte 4 Wochen und 13 Wochen auf Grund des bei der statistischen Auswertung (siehe Anhang Mann-Whitney-U-Test-Tabelle) festgestellten nicht signifikanten Zeiteffektes gemeinsam betrachtet. Dabei zeigten die Kombinationsgruppen mit 24 µg BMP keinen signifikanten Unterschied zu den Einzeldosierungsgruppen 24 µg und 48 µg BMP, jedoch einen signifikanten Unterschied in der Knochendichte zur Einzeldosierungsgruppe mit 96 µg BMP.

Die Knochendichte in den Kombinationsgruppen mit 48 µg BMP war im Vergleich zu 48 µg Einzeldosierung höher. Der Vergleich der Gruppen mit 96 µg BMP und der Kombinationsgruppen mit 48 µg BMP ergab keinen signifikanten Unterschied, d.h. durch die 1,5 µg bzw. 6 µg VEGF-Zugabe wurde ähnliche Knochendichte erzielt wie mit der 96 µg Einzeldosierung (Abbildung 12).

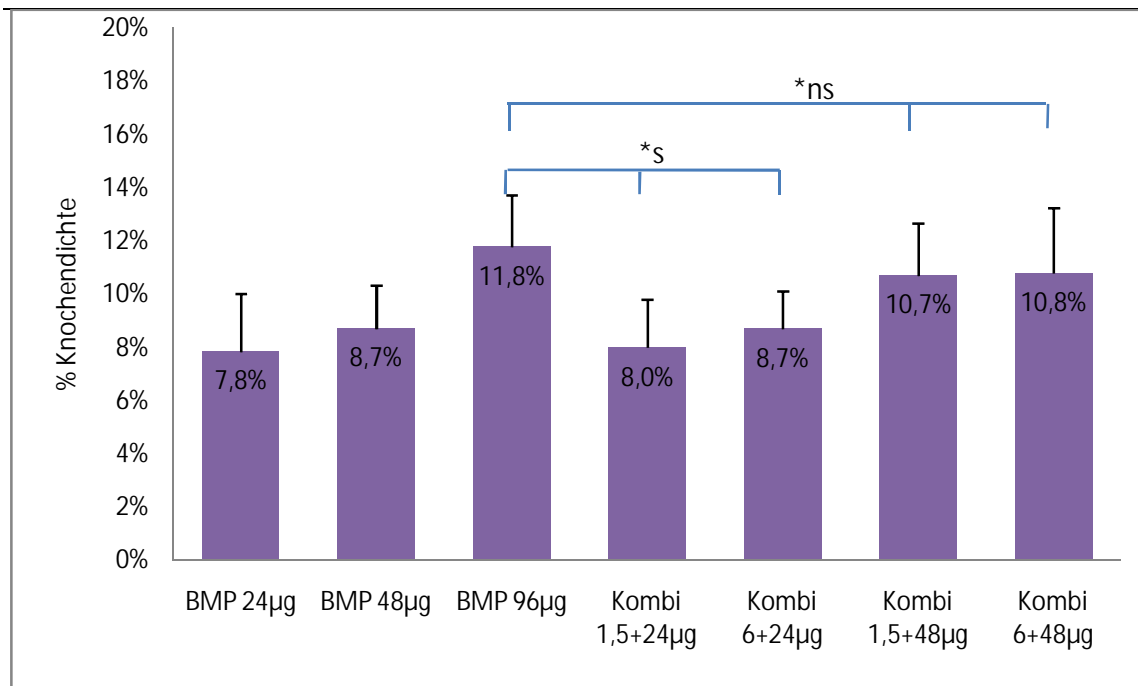


Abbildung 12: Vergleich der Mittelwerte 4-13 Wochen der Kombinationsdosierungen VEGF+BMP und der BMP-Gruppen; $p < 0,05$, $n=6$; *ns nicht signifikant, *s signifikant

3.2 Knochenfläche

3.2.1 BMP

Die Auswertung der gemessenen Knochenfläche über die Zeit in den jeweiligen Gruppen ergab bis auf die Einzeldosierungsgruppe mit 24 µg BMP keinen signifikanten Unterschied. In den Zeitintervallen 4 und 13 Wochen war die Knochenfläche der Gruppe Blank signifikant niedriger zu allen BMP-Einzeldosierungsgruppen. In den 4-Wochen-Gruppen war die Knochenfläche der 96 µg-Gruppe signifikant am größten im Vergleich zu 24 µg/48 µg-Gruppen, wobei sich in der 13. Woche keine signifikanten Unterschiede ergaben (Abbildung 13).

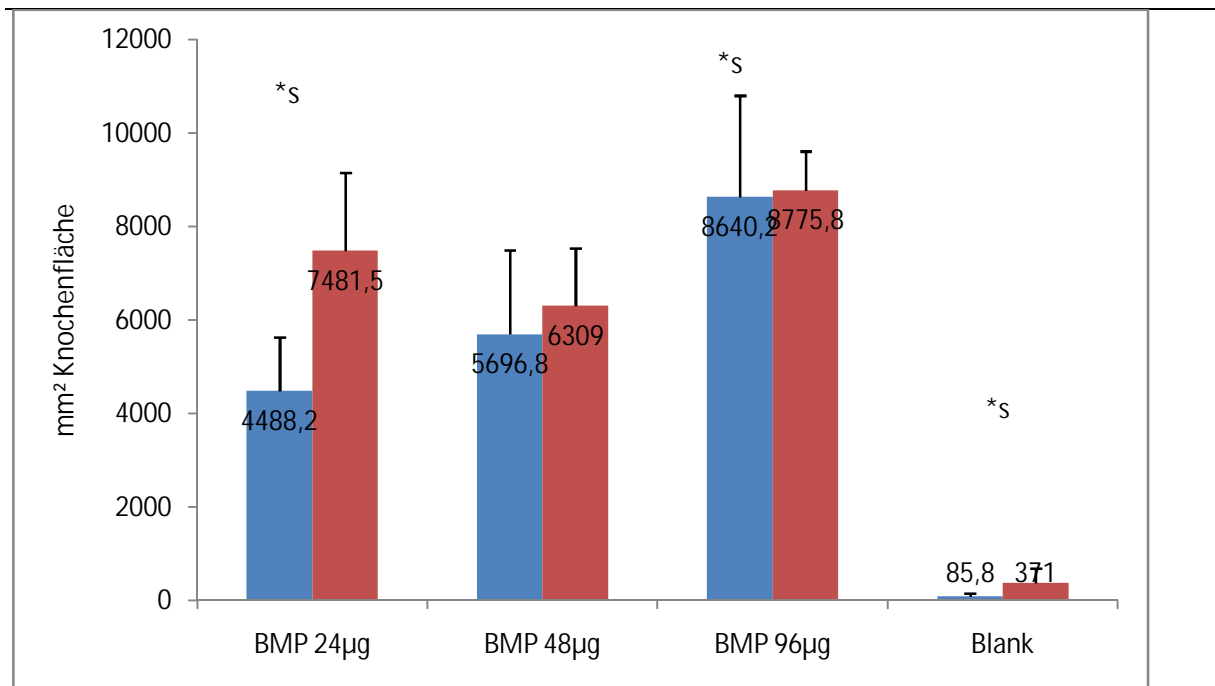


Abbildung 13: Vergleich der Mittelwerte der BMP-Einzeldosierungen und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$; *s signifikant

3.2.2 VEGF

Die Betrachtung der Knochenfläche bei den VEGF-Einzeldosierungen von $0,24 \mu\text{g}$, $1,5 \mu\text{g}$ und $6 \mu\text{g}$ zeigte zu den Zeitpunkten 4 Wochen (blau) und 13 Wochen (rot) keinen signifikanten Unterschied. Der Vergleich Kontrollgruppe(Blank)/VEGF-Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Auswertung der Einzeldosierungen von VEGF zu den Zeitpunkten 4 Wochen und 13 Wochen ergab eine deutlich geringere Knochenfläche als die mit BMP und BMP/VEGF-Kombinationen beladenen Implantate. Die größte Knochenfläche wies die Gruppe mit $6 \mu\text{g}$ nach 4 Wochen auf (Abbildung 14).

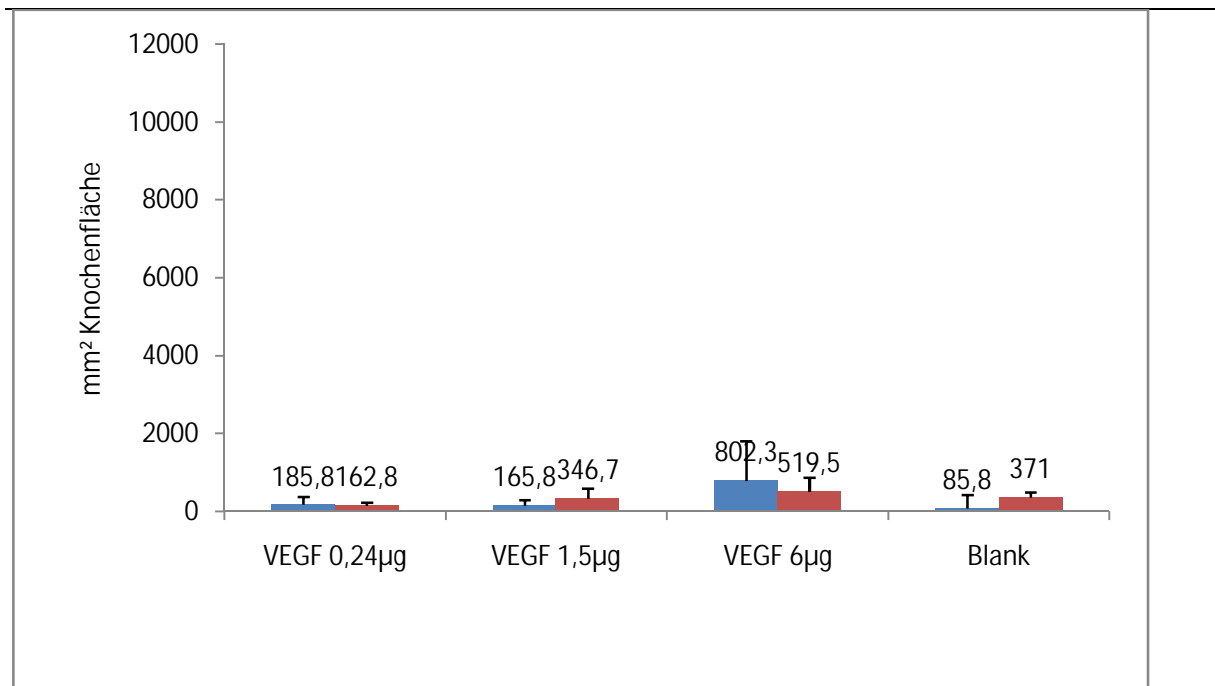


Abbildung 14: Vergleich der Mittelwerte der VEGF-Einzeldosierungen und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$

3.2.3 Kombination BMP/VEGF

Die Auswertung der Knochenfläche bei den Kombinationsdosierungen des VEGF und BMP ergab lediglich einen Signifikanz relevanten Unterschied in der 4. Woche zwischen Kombinationen 6 µg/24 µg und 6 µg/48 µg. Die Kontrollgruppe zeigte eine signifikant geringere Knochenfläche (Abbildung 15).

Die erfassten Knochenflächen bei den mit VEGF und BMP beladenen Implantaten ergab eine Steigerung der Knochenfläche mit den steigenden BMP/VEGF-Konzentrationen ausgenommen 4-Wochen-Gruppe 6 µg/24 µg. Dabei wies die Kombination 6 µg VEGF mit 48 µg BMP die höchste Knochenfläche auf. Im Verlauf der 4. bis 13. Woche hatte die Gruppe mit Kombination 1,5 µg VEGF mit 24 µg BMP die größte Zunahme der Knochenfläche (Abbildung 15).

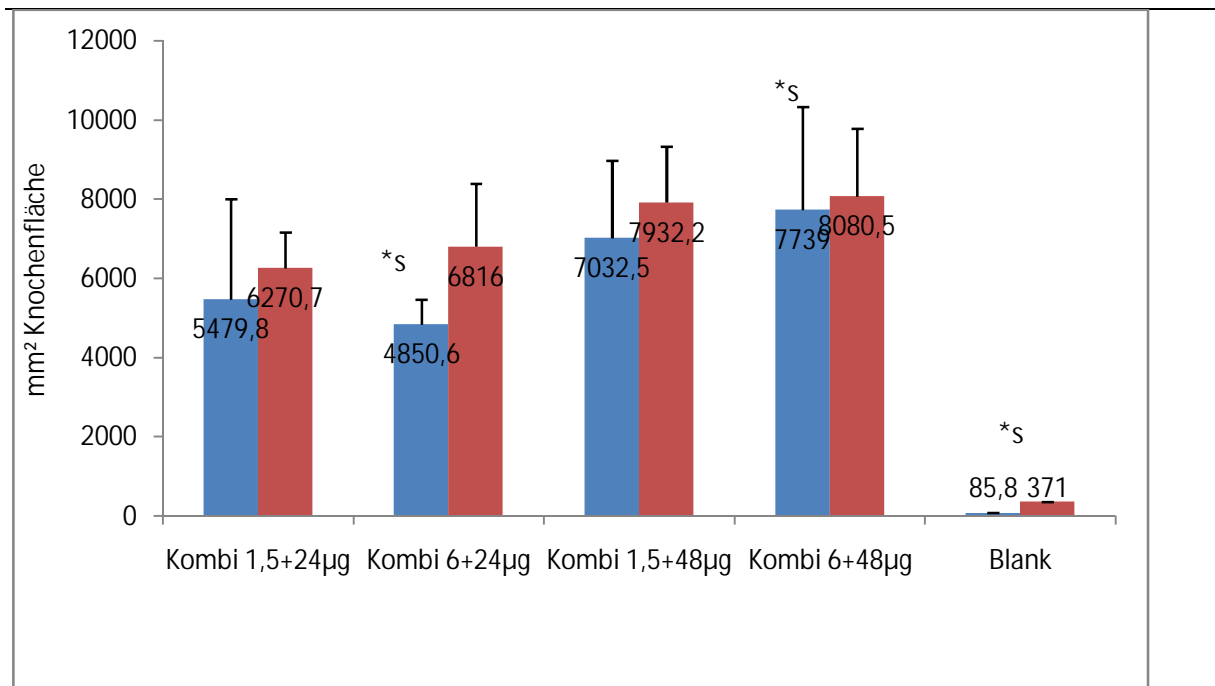


Abbildung 15: Vergleich der Mittelwerte der Kombinationsgruppen und der Kontrollgruppe (Blank); blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$; *s signifikant

3.2.4 Vergleich der Knochenfläche der Einzeldosierungen von BMP und Kombinationen VEGF/BMP

Bei der Betrachtung der 4-Wochen-Ergebnisse konnte ein signifikanter Unterschied zwischen 24 µg BMP-Gruppe und der Kombinationsgruppe 6 µg VEGF mit 48 µg BMP nachgewiesen werden. Nach 4 Wochen war die Knochenfläche der 96 µg BMP Einzeldosierungsgruppe signifikant höher als Kombinationsgruppen mit 1,5 µg/24 µg und 6 µg/24 µg jedoch ohne signifikanten Unterschied zu den Kombinationen 1,5 µg/6 µg VEGF und 48 µg BMP. Im Vergleich der einzelnen Gruppen in der 13. Woche konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (Abbildung 16).

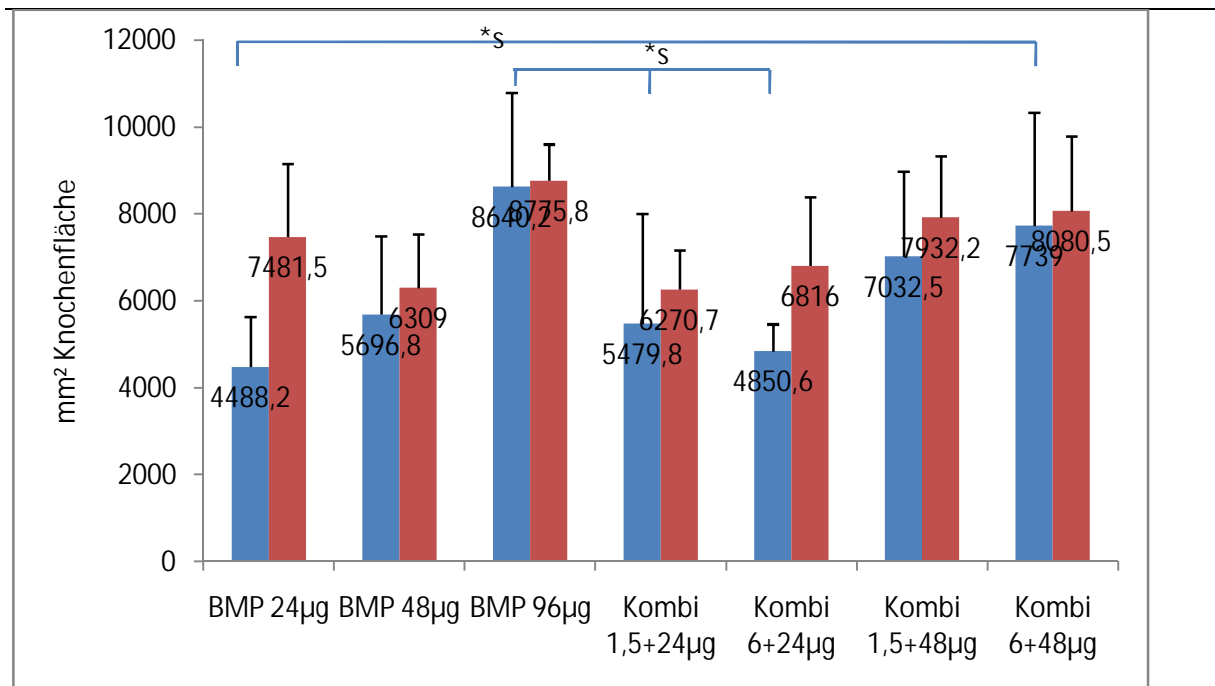


Abbildung 16: Vergleich der Mittelwerte der Knochenflächen der Kombinationsdosierungen VEGF+BMP und der BMP-Gruppen; blau: 4-Wochen-Gruppen; rot: 13-Wochen-Gruppen; $p < 0,05$, $n = 6$

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die nichtparametrische ANOVA-Analyse der Knochendichte ergab keine Zeitabhängigkeit zu den beiden Zeitpunkten 4 und 13 Wochen. Die Varianz wurde mit der Analyse bestätigt. Die 2-Wege-ANOVA-Analyse der Knochenfläche ergab lediglich eine signifikante Zeitabhängigkeit zu den beiden Zeitpunkten 4 und 13 Wochen für die 24 µg BMP-Gruppe.

Die lokale Applikation des Wachstumsfaktors VEGF in unterschiedlichen Dosierungen zeigte keinen Unterschied in der Knochendichte und Knochenfläche zu der Gruppe ohne Wachstumsfaktorbeladung (Blank). Die Steigerung der Knochendichte und der Knochenfläche in den Gruppen der BMP-Dosierungen war konzentrationsabhängig. Die Signifikanz wurde vor allem in der 96 µg BMP-Gruppe bestätigt.

Bei den Kombinationsdosierungen VEGF/BMP ließ sich eine Steigerung der Knochendichte und Knochenfläche mit steigender BMP-Konzentration erkennen. Die Kombinationsgruppen mit 48 µg BMP hatten eine ähnliche Knochendichte und Knochenfläche wie die Einzelgruppen mit 96 µg BMP.

4 Diskussion

Die knöchernen Defekte entstehen nicht nur durch direkte Traumata und Tumore, sondern sind oft auch Folge der Entzündungen. Diese sind zu ca. 10% posttraumatisch und führen zu erhöhter Morbidität (Cui et al. 2013). Die Wiederherstellung der Kontinuität und Reparatur von *Critical-size*-Knochendefekten durch Substitutionstherapie erfordert das Verständnis der Knochenbiologie und die Kontrolle der Knochengewebsmorphogenese. Mit Hilfe der Manipulation in der osteoinduktiven Signalgebung kann auf die Gewebeentwicklung mit ex vivo hergestellten Wachstumsfaktoren Einfluss genommen werden (Sundelacruz und Kaplan 2009).

Trotz der jahrzehntelangen Forschung und Entwicklung unzähliger alternativer Knochenersatztherapien gilt der autologe Knochenersatz als Goldstandard für die Versorgung von Knochendefekten (Moore et al. 2001). Viele Studien belegen die hohe Morbidität. So konnte 2011 in einer literaturzusammenfassenden Studie eine Morbiditätsrate von 19,37% festgestellt werden. Die meisten bleibenden Komplikationen betrafen chronische Schmerzen der Entnahmestelle mit 7,75% und Sensibilitätsstörungen mit 4,81%. Die Rate an direkt postoperativen Komplikationen mit Schmerzen, Hämatombildungen, Seromen, Wunddehiszenzen, Infektionen und Frakturen der Entnahmestelle ist nicht zu vernachlässigen und bewirkt ein Umdenken im chirurgischen Vorgehen (Dimitriou et al. 2011).

Die genannten Aspekte der Behandlung knöcherner Defekte und deren klinische Relevanz bestätigt die weitere Suche nach einem idealen Knochenersatzmaterial. Die aktuelle Forschung befaßt sich mit Knochenheilung unterstützendem Gewebeersatz und benutzt Stammzellen, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und osteokonduktive Trägermaterialien. In vielen Klein- und Großtierstudien konnten bereits vielversprechende Ergebnisse in der Regeneration der Knochendefekte erzielt werden. Einige aktuelle Studien befassen sich mit der Unterstützung der Knochenneubildung durch die Kombination von osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktoren und konnten die Effektivität der Kombinationstherapie nachweisen. Dabei herrscht weder Einigkeit über die jeweilige Konzentrationshöhe noch über die Beladung und Auswahl des Trägermaterials (Gothard et al. 2014).

Im Rahmen dieser Studie sollte im Tiermodell der Einfluss der Kombinationstherapie auf die Knochenregeneration in vivo mit lokal applizierten osteogenen Wachstumsfaktoren BMP und angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF auf PDLLA/CaCO₃-Kompositsträgern radiomorphometrisch untersucht werden.

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Signalmoleküle, die an der Erneuerung und dem Wachstum von Geweben beteiligt sind. Durch die intensive Erforschung vor allem auf dem Gebiet der Knochenregeneration sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Faktoren beschrieben worden (Schliephake 2002). Die am meisten erforschten Vertreter sind *bone morphogenetic proteins* (BMP's), welche bei der Knochenentstehung eine große Rolle spielen (Giannoudis und Einhorn 2009). Die BMPs sind in der Knochensubstanz in sehr geringer Dosierung von 1 µg/g Knochenmasse zu finden. In den meisten Studien wird mit einer Überdosierung gearbeitet (Schliephake 2002). Es herrscht Uneinigkeit über die richtige Dosierung der Wachstumsfaktoren. Die verwendeten BMP-Konzentrationen variieren zwischen 0,1 µg bis 5 mg in Kleintierversuchen und 5 µg bis 100 mg in Großtierversuchen (Gothard et al. 2014). Die Überbrückung größerer Knochendefekte durch Knochenersatzstoffe zeigt oft eine schlechte Knochenregeneration aufgrund unzureichender Vaskularisierung. Studien haben gezeigt, dass bei eingeschränkter Vaskularisierung die alleinige Anwendung von osteoinduktiven Faktoren zu keiner erfolgreichen Heilung führte (Geiger et al. 2007). Vor allem die Entstehung von neuen Gefäßen im Bereich der inserierten Knochenersatzstoffe ist für deren Überleben entscheidend, da die Diffusionsstrecke für Nährstoffe, Sauerstoff und Abbaustoffe auf ca. 100 µm begrenzt ist und nur für Gewebe mit geringer metabolischer Aktivität ausreicht (Santos und Reis 2010). Street et al. fanden mit ihrer in vivo Arbeit die herausragende Bedeutung von VEGF für Angiogenese, Osteogenese und Frakturheilung durch die Inhibierung des Faktors heraus, dass während der Chondro- und Osteogenese eine gestörte Knochenheilung hervorbrachte (Street et al. 2002).

Sowohl die Angiogenese als auch die Osteogenese sind entscheidend für die Knochenregeneration. Die gleichzeitige Freisetzung von osteogenen Faktoren (BMP) und angiogenen Faktoren (VEGF) haben einen additiven Effekt auf die Knochenregeneration (Zhang et al. 2011).

Jedoch in welchem Maße die Knochenneubildung durch kombinierte Freisetzung beeinflusst wird ist noch nicht abschließend geklärt. So zeigten Kempen et al. im Tiermodell eine Erhöhung der ektopen und orthotopen Knochenneubildung der BMP/VEGF-Kombination verglichen mit der alleinigen Beladung mit BMP nach acht Wochen Beobachtungszeit (Kempen et al. 2009). Geuze et al. konnten im Beobachtungszeitraum von sieben Wochen keine orthotope und ektipe Verbesserung der Knochenneubildungsrate durch Zusatz von VEGF zum BMP auf einem Mikropartikel-Gelatine-Trägermaterial in vivo feststellen (Geuze et al. 2012). Auch Schmitt et al. führten ein Versuch an Tieren mit kombinierter BMP- und VEGF-Beladung eines Kollagen-Trägermaterials durch. Die histomorphometrische und mikroradiographische Auswertung zeigte nach 30 und 60 Tagen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kombinationsgruppen und Einzelgruppen (Schmitt et al. 2013). Wiederrum hat Zhang et al. eine Verbesserung der Knochenneubildungsrate durch

kombinierte VEGF und BMP Freisetzung von Seiden-Hydrogel-Trägermaterial in vivo festgestellt (Zhang et al. 2011).

Letztendlich können durch die jeweiligen Versuche keine allgemeingültigen Aussagen bezüglich der Wirksamkeit der kombinierten Freisetzung der Faktoren auf die Knochenneubildungsrate getroffen werden, da die Vergleichbarkeit fehlt. Deshalb sollte das Gebiet der kontrollierten Freisetzung der Kombination von Wachstumsfaktoren weiter beforscht werden. Zusätzlich würde es das Verständnis der Prozesse in der Geweberegeneration fördern.

4.1.2 Herstellung der Implantate

Die Auswahl des Trägermaterials für die Beladung mit Wachstumsfaktoren ist typischerweise erforderlich um den Defekt zu füllen oder zu überbrücken und ist multifaktoriell. Das Gerüst muss bestenfalls die Knochenstruktur nachahmen, biokompatibel sein, biologisch abbaubar und gute biomechanische Eigenschaften aufweisen (Gothard et al. 2014).

Neben xenogenen Materialien, Trikalziumphosphat, Hydroxylapatit und Kollagen kommen polymerbasierte Ersatzstoffe wie das Polylactid zur Anwendung. Unzählige Studien beschäftigen sich mit der Frage nach der richtigen Zusammensetzung des Trägermaterials. So zum Beispiel Borselli et al. haben festgestellt, dass mit VEGF beladenen Polylactid-co-Glykolid (PLGA) Kopolymer in Verbindung mit Kollagengerüst höhere Rate an Vaskularisation aufwiesen als nur das mit VEGF beladene Kollagen (Borselli et al. 2010).

Andere benutzten als Trägermaterial ein natürliches Material wie Seide, Alginat oder Chitosan allein oder in Verbindung mit Polymer (Schliephake et al. 2015). De la Riva et al. führten In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur Zusammensetzung des optimalen Trägermaterials durch. Dabei wurden die mit VEGF beladenen Alginat-, Chitosan- und Chitosan-Polymer-Träger auf deren Freisetzungskinetik untersucht. Die besten Ergebnisse brachten die kombinierten Träger mit Polymer (De la Riva et al. 2009). Kandziora et al. fanden 2002 heraus, dass in vivo die mit BMP beladenen PDLLA-Träger im Vergleich zu mit BMP beladenen Kollagenträger höhere Verknöcherungsraten aufwies, was auf die Fähigkeit zur kontrollierten Freisetzung des Trägermaterials hinweist (Kandziora et al. 2002)

Polylaktidbasierte Materialien erfüllen zwar viele der Kriterien für einen optimalen Trägerstoff, jedoch wirken sie bei deren Degradation der Knochenneubildung entgegen. Sie setzen beim Zerfall Milchsäure frei, die eine Entzündungsreaktion im Gewebe verursacht (Bergsma et al. 1995). Die In-vitro-Studie von Schliephake et al. stellte den Zeitpunkt des pH-Abfalls mit 18 bis 21 Wochen fest (Schliephake et al. 2007). Um den pH-Abfall entgegen zu wirken setzte man Kalziumkarbonate oder Kalziumphosphate in unterschiedlicher Dosierung hinzu und bewirkte eine Neutralisierung der Milchsäure. Die so produzierten Polylaktid-Kalziumkarbonat-Implantate zeigten nach vollständigen Abbau einen Ersatz durch Knochen (Schiller et al. 2004; Backhaus et al. 2013). Zur Verbesserung der Freisetzung und der biologischen Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren verwendete die In-vitro-Studie von Schliephake et al. eine lösungsmittelfreie Herstellung der Polylaktid-Kalziumkarbonat-

Scaffolds mit Kohlendioxid-Überdruck-Behandlung. Sie stellten fest, dass die biologische Wirksamkeit und die Freisetzung des rhBMP2 im Vergleich zur lösungsmittelhaltigen Herstellung der Träger signifikant verbessert werden konnte (Schliephake et al. 2015).

Infolgedessen verwendeten wir als Trägerstoff für Wachstumsfaktoren VEGF und BMP lösungsmittelfreie Poly-laktid-Kalziumkarbonat-Scaffolds um die Freisetzung in vivo zu untersuchen. Obwohl es zahlreiche Studien zum Einsatz von Poly-laktid in der Literatur zu finden sind ist das vollständige Verstehen des Degradationsverhaltens, deren vollständiger Abbau, Ersatz durch Knochengewebe und die Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren notwendig und sollte in weiteren In-vivo-Langzeitstudien untersucht werden.

4.1.3 Tiermodell

Ungeachtet der Fortschritte der In-vitro-Gewebeersatzforschung müssen Studien an Tieren durchgeführt werden um die Komplexität des Organismus in Gänze zu verstehen und das Verhalten der neuen Materialien zu untersuchen.

Die Tiermodelle werden sorgfältig für das jeweilige zu untersuchende Material ausgewählt und können unter Studienbedingungen dazu beitragen das klinische Potential neuer Technologien wie den Einsatz von Wachstumsfaktoren zu beurteilen (Khan und Lane 2004). Yousefi et al. fanden in ihrer literaturzusammenfassenden Arbeit heraus, dass die Simulation der biomechanischen und biochemischen Vorgänge nur in vivo möglich ist (Yousefi et al. 2015). Das Tiermodell Ratte eignet sich gut zur Untersuchung der komplexen ineinandergreifenden Vorgänge der Knochenregeneration und kann Aussagen zur Biokompatibilität, Gewebeantwort (d.h. Einwachsen des Knochens in das Konstrukt), Abbaueigenschaften von Implantatmaterialien, Überleben von transplantierten Zellen und mechanische Funktion liefern (Muschler et al. 2010).

Gothard et al. führten in ihrer Übersichtsarbeit einen Vergleich zwischen verschiedenen Tiermodellen in Hinblick auf die Fragestellung der knöchernen Regeneration auf und stellten fest, dass Ratten als akzeptierte Spezies für die Imitierung von menschlichen Knochenstoffwechselforgängen gelten (Gothard et al. 2014). Auch Untersuchungen an erkrankten Knochengewebe (z. B. osteoporotischer Knochen), welches ein anderes Regenerationsmuster zeigt muss in vivo durchgeführt werden, da die veränderten Stoffwechselforgänge in vitro nicht imitierbar sind (Poser et al. 2014).

Bei der Erforschung der Knochenregeneration im Rahmen dieser Studie war es besonders wichtig die Auswirkung der osteokonduktiven Trägermaterialien und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der osteogenen Regenerationsfähigkeit am lebenden Organismus zu untersuchen. Dieses ist unerlässlich in der Entwicklung geeigneter klinischer Therapiekonzepte. Wir verwendeten zur Durchführung der Experimente Sprague-Dawley-Ratten, die bereits in mehreren anderen Studien als geeignetes Tiermodell für die Untersuchung der Wirkung der Wachstumsfaktoren angewendet werden konnten (Saito et al. 2003; Muschler et al. 2010). Schlussendlich ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse für die Anwendung im menschlichen Körper nicht vollständig möglich, da jedes Tiermodell nur

teilweise die biomechanischen und biochemischen Verhältnisse im Menschen darstellt. Es ist also notwendig die Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen durchzuführen um die Vorhersagbarkeit in der späteren humanen Anwendung zu erhöhen (Horner et al. 2010).

4.1.4 Durchführung der Auswertung

Da das Digitale Volumentomogramm (DVT) in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zur alltäglichen Routine der Beurteilung des Knochens seit vielen Jahren gehört und als etabliertes Verfahren zur Auswertung des Knochens gilt wurde es von uns zur Beurteilung des neu gebildeten Knochens eingesetzt.

Kröpil et al. stellten fest, dass das DVT zur quantitativen Messung des Knochens nicht nur im Bereich der Gesichtsregion sondern auch im Bereich der Röhrenknochen eines Tiermodells eignet. Sie führten radiographische und histomorphometrische Auswertung des neu entstandenen Knochens durch und fanden heraus, dass die beiden Auswertungsmethoden zu 75% übereinstimmten (Kröpil et al. 2012). Auch Cankaya et al. fanden heraus, dass die Ergebnisse der Knochenmessung einer Knochennekrose beim Rattenmodell im DVT mit den histomorphometrischen Ergebnissen korrelierten (Cankaya et al. 2011).

Jedoch bieten das DVT und deren Einstellungen wie auch andere radiologische Verfahren Fehlerquellen, was zur Fehlinterpretationen führen kann. Größere Voxelgrößen (0,3-0,4 mm) führen zur geringeren räumlichen Auflösung als kleinere Voxelgrößen. Es sollten möglichst kleine FOVs verwendet werden um das Seitenrauschen zu minimieren. Die Artefakte durch Zähne oder Metall müssen berücksichtigt werden. Eine möglichst lange Scanzeit verhindert Unterabtastung und schlechtere Auflösung. Die Computermonitore sollten möglichst hochauflösend sein. Bei der Auswertung muss man bedenken, dass in Umbau befindlicher Knochen mit osteoklastischer Aktivität weniger dicht dargestellt wird und fehlinterpretiert werden kann. Auch durch die Einführung von Kontrollgruppe und mehreren Versuchsgruppen können Fehlinterpretationen vermieden werden (Molen 2010).

In der von uns durchgeführten Untersuchung wurden alle oben genannten Kriterien berücksichtigt. Anschließend erfolgte die Auswertung des dreidimensionalen Scans mit Fiji/ImageJ-Programm. Schindelin et al. beschrieben bereits 2012 die Anwendung und die Vorteile des Programms (Schindelin et al. 2012).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Betrachtung der unterschiedlichen BMP-Konzentrationen in der lokalen Applikation der Faktoren gab die bereits bekannte Dosisabhängigkeit der Knochendichte und Knochenfläche von der BMP-Konzentration wieder. Vor allem die 96 µg-Gruppen unterschieden sich signifikant in radiographisch festgestellter Knochendichte und Knochenfläche nach vier Wochen. In der 13. Woche war keine Signifikanz beim erkennbaren Unterschied in der Dichte und Fläche nachweisbar (Abbildungen 9, 13). Die 24 µg- und 48 µg-BMP-Gruppen

ließen lediglich nach vier Wochen einen Unterschied in der Knochendichte erkennen, jedoch ohne Nachweis einer Signifikanz (Abbildung 9). Die Knochenfläche der 24µg-BMP-Gruppe war signifikant unterschiedlich in der 4. und 13. Woche (Abbildung 13). Auch zahlreiche andere Studien belegten diese Dosisabhängigkeit der Knochenneubildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten wie Gothard et.al. zusammengefasst hatte, wobei die Unterschiede in den BMP-Dosierungen stark voneinander abwichen (Gothard et al. 2014). Bei der Untersuchung der Gruppen mit VEGF-Einzeldosierungen zeigten sich deutlich niedrigere Raten an Knochendichte und Knochenfläche im Vergleich zu Gruppen mit BMP-Einzeldosierungen. Es konnte weder nach 4 Wochen noch nach 13 Wochen eine verbesserte Knochenneubildung nachgewiesen werden (Abbildungen 10, 14). Zum ähnlichen Ergebnis kamen Patel et al. und Xiao et al. in ihren In-vivo-Studien (Patel et al. 2008; Xiao et al. 2011). Die Kombinationsgruppen zeigten nach 4 und 13 Wochen in den Gruppen mit 48 µg BMP eine erhöhte Knochendichte im Vergleich zu 24µg-BMP-Kombinationsgruppen, dies jedoch unabhängig von der VEGF-Konzentration und bei fehlender Signifikanz. Nach 13 Wochen hatte die Kombination aus 1,5 µg VEGF und 48 µg BMP den größten Knochendichtezuwachs (Abbildung 11). Die Knochenfläche ergab lediglich einen Signifikanz relevanten Unterschied in der vierten Woche zwischen Kombinationen 6 µg/24 µg und 6 µg/48 µg. Es zeigte sich eine Steigerung der Knochenfläche mit den steigenden BMP/VEGF-Konzentrationen. Dabei wies die Kombination 6 µg VEGF mit 48 µg BMP die größte Knochenfläche auf (Abbildung 15). Im Vergleich der Kombinationsgruppen zu den Einzeldosierungen des BMP hat die Knochendichte und Knochenfläche der 96µg-BMP-Einzeldosierungsgruppe einen vergleichbaren Zuwachs über den Beobachtungszeitraum wie die Kombinationsgruppen mit 48 µg BMP (Abbildungen 12, 16). Auf Grund dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass durch die Zugabe von geringen Dosen von VEGF die BMP-Konzentration halbiert werden kann. Dieses kann Vorteile in der Nebenwirkungsrate bringen, da die aktuell hohen klinisch eingesetzten Dosen von BMP Nebenwirkungen wie Schwellung, Wundheilungsstörungen und Knochenresorption hervorrufen (Carreira et al. 2014).

Auch Lohse und Mitarbeiter stellten in Ihrer histomorphometrischen und radiomorphometrischen *slow release* In-vivo-Untersuchung fest, dass geringe Dosen von VEGF in Kombination mit BMP im Bereich des Trägermaterials zu erhöhten Knochenvolumen und Knochendichte im Vergleich zu Einzeldosierungen von BMP führten. Im Gegensatz zur aktuellen Beobachtung in der Zeitabhängigkeit gab es hier einen Unterschied beim Knochenvolumen und Knochendichte. Die Knochendichte nahm zu und das Knochenvolumen ab, wobei der Unterschied der Kombinationsdosierungen zu den Einzeldosierungen bei beiden signifikant gewesen ist (Lohse et al. 2015).

Die Studien von Hernandez et al. und Patel et al. stellten ähnliche und signifikante Abhängigkeiten in den Untersuchungen der kombinierten Freisetzung von VEGF und BMP fest (Patel et al. 2008; Hernández et al. 2012). Hernandez et al. fanden heraus, dass die kontrollierte Freisetzung von VEGF in Verbindung mit BMP für die Knochenregeneration vorteilhaft sein kann (Hernández et al. 2012). Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen von Young et al. und Kempen et al. eine Freisetzungsteigerung von VEGF in den ersten 24 Stunden in vitro bzw. drei Tagen in vivo und anschließenden raschen Abfall.

Sie konnten zudem keinen signifikanten Unterschied der Kombinationsgruppen zu den BMP-Einzelgruppen in den Auswertungszeitraum von 12 Wochen bzw. 8 Wochen feststellen (Kempen et al. 2009; Young et al. 2009). Das lässt vermuten, dass die kombinierte kontrollierte und langsame Freisetzung nicht nur von BMP sondern auch von VEGF für den Effekt der Knochenvolumenzunahme entscheidend ist.

Auch Vempati et al. stellten in ihrer Literaturrecherche fest, dass die Geschwindigkeit der VEGF-Sekretion ein wichtiger Treiber für die VEGF-induzierte Angiogenese ist. Diese wird durch unterschiedliche Prozesse unter anderem durch Diffusion, Sequestrierung in der extrazellulären Matrix, enzymatische Freisetzung und kompetitive Bindung beeinflusst. Es besteht unterschiedliche Affinität der VEGF-Isoformen zur Bindung an extrazelluläre Matrixproteine. Das von uns verwendete VEGF₁₆₅ zeigt im Vergleich zu anderen Isoformen eine höhere Affinität zur in der Matrix befindlichen Heparinsulfat-Proteoglykanen, welche VEGF sequestrieren. Das bedeutet die Erhöhung des Gradienten und dadurch schnellere Induktion der Angiogenese (Vempati et al. 2014).

Diese Fakten bringen Unklarheit bezüglich des richtigen Zeitpunktes für die Gewebebildung durch VEGF und deren Auswertung. Durch die unterschiedlichen Mechanismen der Angiogenese vor allem durch das intussuszeptive Wachstum (Teilung der Kapillaren durch Bildung transkapillärer Säulen in zwei Tochterkapillaren) führt das VEGF zu rascher und umfangreicher Vaskularisierung im Bereich des Trägermaterials, begleitender Knochendifferenzierung und daraus resultierender Knochenvolumenzunahme (Vempati et al. 2014). Festzustellen ist, dass dieser Effekt nur dann zur Knochenvolumenzunahme führt, wenn ausreichend osteoinduktive Stoffe durch Freisetzung von BMP vorhanden sind (Lohse et al. 2015).

Peng et al. fanden 2005 durch eine in vitro/in vivo-Studie heraus, dass ein bestimmtes Verhältnis zwischen BMP und VEGF Auswirkungen auf die Höhe des Knochenvolumens hat und ein hoher Anteil an VEGF sogar die Knochenregeneration hemmt (Peng et al. 2005). Dies kann auf ein erhöhtes Rekrutieren von Osteoklasten beim Verwenden von hohen Dosen von VEGF zurückzuführen sein. Außerdem weist es darauf hin, dass VEGF-induziertes Knochenwachstum nicht nur von der Gefäßdichte und der Nährstoffversorgung abhängig ist. Die Literaturrecherche verdeutlicht, dass nicht nur BMP sondern auch VEGF einen direkten Effekt auf die Stammzellen ausübt und zur Differenzierung der Stammzellen beiträgt (Cui et al. 2013; Moser et al. 2018).

Andererseits können die von den Osteoblasten produzierten VEGF's unter Anwesenheit von BMP die notwendige Angiogenese für die Knochenregeneration assoziieren (Deckers et al. 2002). Das bedeutet, dass der Effekt der durch BMP allein hervorgerufen wird bei niedrigen Konzentrationen von VEGF größer oder gleich ist zur Kombinationen der Faktoren.

Ein weiterer Grund für die Unterschiede in den Ergebnissen der Studien zur Knochenregeneration können neben den VEGF/BMP-Verhältnis die Möglichkeit zur kontrollierten Freisetzung aus den Trägermaterialien und die Verwendung unterschiedlicher Auswertungszeiten sein. So haben Hernandez et al. in ihrer Studie nicht nur BMP sondern auch VEGF verzögert freigesetzt und daraus resultierende erhöhte Knochenregeneration erzielt (Hernández et al. 2012). Die Untersuchung von Kempen et al. unterstützt diese

Aussage, denn von ihm verwendetes Trägermaterial führte nur zur initialen VEGF-Freisetzung was zur Abwesenheit der vermehrten Knochenregeneration in den VEGF/BMP-Gruppen durch fehlende kontrollierte VEGF-Freisetzung führte (Kempen et al. 2009).

Die Auswertungszeiten haben ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Feststellung von Unterschieden. So haben Young et al. und Patel et al. zwar gleiches Trägermaterial für die Beladung mit Faktoren gewählt, jedoch erfolgte die Auswertung von Patel et al. nach 4 Wochen und 12 Wochen, wobei die signifikanten Ergebnisse nach 4 Wochen festzustellen waren. Während Young et al. ihre Studie nur zu einem Zeitpunkt, nach 12 Wochen auswerten, wobei hier kein Effekt mehr feststellbar war (Patel et al. 2008; Young et al. 2009).

4.3 Ausblick

Effektive Strategien auf dem Gebiet der Knochengewebsherstellung und -heilung, welche biochemische, biomechanische und physikalische Aspekte berücksichtigen, erfordern zur Imitierung der natürlichen Knochenregeneration eine Umgebung mit kontrollierter Freisetzung von mehreren unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (Carreira et al. 2014). Dieses wissenschaftliche Gebiet hat in den letzten Jahren zwar gute Ergebnisse bezüglich verschiedener Kombinationen von angiogenen und osteogenen Wachstumsfaktoren mit und ohne Einsatz von Stammzellen erbracht, jedoch ohne sicheres Handling mit den jeweiligen Verhältnis der Faktorenkonzentrationen. Zudem bleibt die Herausforderung der Heilung und Rekonstruktion von Knochendefekten kritischer Größe durch Knochenersatzmaterialien, die auf Grund ihrer Größe eingeschränkte Gefäßversorgung aufweisen. Auch die gegenseitige Beeinflussung der Angio- und Osteogenese, Festlegung des potentesten Wachstumsfaktors für die Knochenregeneration und das Verbessern der Materialien für die kontrollierte Freisetzung der Faktoren sollte Gegenstand der zukünftigen Forschung auf dem Gebiet der Knochenregeneration sein (Cui et al. 2013).

Die Ergebnisse dieser Studie können zum besseren Verständnis der Wechselwirkung der Wachstumsfaktoren beitragen. Der Effekt der Steigerung der Knochengeweberegeneration bei der die BMP-Konzentration durch die Zugabe von VEGF halbiert werden kann, wurde in dieser Studie gezeigt. Jedoch fehlt die notwendige Signifikanz, welche nur durch kontrollierte Freisetzung der Faktoren erreicht werden kann (Lohse et al. 2015).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende In-vivo-Studie an männlichen Wistar-Ratten hatte als Ziel eine Verbesserung der Knochenregeneration an Unterkieferdefekten kritischer Größe durch kombinierte Freisetzung von osteogenen (BMP) und angiogenen (VEGF) Faktoren. Die verwendeten PDLLA/CaCO₃-Komposit-Scaffolds wurden jeweils in Einzeldosierungen und kombiniert mit 24 µg, 48 µg und 96 µg BMP sowie 1,5 µg und 6 µg VEGF durch Auftropfen und Adsorption beladen. Die so entstandenen Implantate konnten anschließend in die Kieferdefekte von Wistar-Ratten inseriert werden. Die Beobachtungszeiträume wurden auf 4 Wochen und 13 Wochen festgelegt. Nach dem Ablauf der festgelegten Zeiträume und der Präparation der Kiefer führten wir die radiologische Untersuchung mittels DVT und anschließende computergestützte radiomorphometrische Auswertung an rekonstruierten axialen Schnittbildern durch. Das dabei neu entstandene Knochenvolumen wurde in Prozent der Gesamtfläche der Kiefer angegeben und als Knochendichte statistisch mittels nichtparametrischer Varianzanalyse überprüft. Die neu entstandene Knochenfläche wurde in mm² ausgedrückt und mittels 2-Wege-anova-Analyse bezüglich der Signifikanz verifiziert.

Der paarweise Vergleich der Ergebnisse ergab eine signifikant hohe Knochendichte für 96 µg BMP im Vergleich zu allen anderen Einzeldosierungen und Kombinationen außer für Kombinationen 1,5 µg/6 µg VEGF mit 48 µg BMP ($p < 0,05$). Keines der Implantate zeigte einen signifikanten Unterschied in der Knochendichte zwischen 4 Wochen und 13 Wochen. Der zeitabhängige Vergleich der Knochenfläche in den 4-Wochen-Gruppen wies zwar signifikant hohe Fläche der 96µg-BMP-Einzelgruppen zu den Einzeldosierungsgruppen und Kombinationsgruppen mit 24 µg BMP nach. Jedoch fehlte der signifikante Unterschied zu den 48µg-Kombinationsgruppen ($p < 0,05$). Nach 13 Wochen konnte dieser Effekt beim Vergleich der Knochenflächen nicht nachgewiesen werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass in dem verwendeten Modell durch die kombinierte Freisetzung von VEGF und höheren Dosen von BMP mit einer Dosisreduktion des BMP um die Hälfte der gleiche Effekt der Knochenregeneration in Verbindung mit VEGF erzielt werden kann.

6 Anhang

6.1 Tabellen zur statistischen Analyse der Knochendichte

Tabelle 2: Mittelwert +/- Standardabweichung; Median (Minimum, Maximum) des Knochenvolumens in Prozent für 4 und 13 Wochen

Implantat	4 Wo	13 Wo
BMP 24	7.48 +/- 2.49 ; 7.71 (3.71,10.58)	8.71 +/- 1.91 ; 8.7 (6.14,10.85)
BMP 48	8.75 +/- 2.2 ; 8.25 (6.55,12.82)	8.66 +/- 1.07 ; 9 (6.55,9.45)
BMP 96	12.66 +/- 2.83 ; 13.36 (8.42,15.53)	10.88 +/- 1.11 ; 10.59 (9.85,12.61)
Blank	0.15 +/- 0.11 ; 0.13 (0.03,0.32)	0.54 +/- 0.4 ; 0.46 (0.09,1.05)
Kombi 1.5+24	6.99 +/- 1.86 ; 6.72 (4.29,8.83)	8.99 +/- 1.77 ; 9.09 (6.54,11.29)
Kombi 1.5+48	10.26 +/- 1.9 ; 10.95 (6.86,12.27)	11.13 +/- 2.04 ; 11.15 (8.47,13.71)
Kombi 6+24	8.87 +/- 1.36 ; 8.99 (6.64,10.31)	8.51 +/- 1.5 ; 8.63 (6.51,10.57)
Kombi 6+48	10.81 +/- 3.65 ; 11.04 (6.98,15.49)	10.76 +/- 1.26 ; 10.46 (9.44,12.71)
VEGF 0,24	0.29 +/- 0.33 ; 0.09 (0.04,0.77)	0.19 +/- 0.11 ; 0.15 (0.13,0.42)
VEGF 1,5	0.26 +/- 0.19 ; 0.17 (0.1,0.55)	0.46 +/- 0.34 ; 0.41 (0.11,0.99)
VEGF 6	1.37 +/- 1.72 ; 0.49 (0.26,3.35)	0.67 +/- 0.49 ; 0.55 (0.23,1.59)

Tabelle 3: Nichtparametrische ANOVA-Analyse

Effect	Sum Sq	Df	F value	p-value
Implantat	115755	10	37.8	< 0.001
Laufzeit	529.6	1	0.3637	0.5478
Implantat:Laufzeit	10980	10	0.8101	0.6195

Tabelle 4: Mann-Whitney U-Test zum paarweisen Vergleich, P-Wertberechnung nach Bonferroni-Holm-Methode

	BMP 24	BMP 48	BMP 96	Blank	Kombi 1.5+24	Kombi 1.5+48	Kombi 6+24	Kombi 6+48	VEGF 0,24	VEGF 1,5
BMP 48	1									
BMP 96	0.0504	0.047								
Blank	0.0029	0.0022	< 0.001							
Kombi 1.5+24	1	1	0.0281	< 0.001						
Kombi 1.5+48	0.1916	0.3201	1	< 0.001	0.1916					
Kombi 6+24	1	1	0.0364	< 0.001	1	0.2439				
Kombi 6+48	0.4617	0.4453	1	< 0.001	0.2115	1	0.5613			
VEGF 0,24	0.0029	0.0022	0.0029	1	0.0029	0.0029	0.0029	0.0022		
VEGF 1,5	0.0029	0.0022	< 0.001	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	1	
VEGF 6	0.0055	0.0041	< 0.001	0.9442	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.1916	1

6.2 Tabellen zur statistischen Analyse der Knochenfläche

Tabelle 5: Zwei-Wege-ANOVA-Analyse, Sidak's multiple comparisons test für 4 Wochen und 13 Wochen. ns nicht signifikant, * signifikant

	<i>Mean Differenc e</i>	<i>95% Confidenc e Interval of Difference</i>	<i>Significan t</i>	<i>Summar y</i>	<i>Adjuste d P Value</i>
4 Wochen					
BMP 24µg vs. BMP 48µg	-1209	-4066 to 1649	No	ns	0,9999
BMP 24µg vs. BMP 96µg	-4152	-7137 to - 1167	Yes	***	0,0004
BMP 24µg vs. VEGF 0,24µg	4302	1318 to 7287	Yes	***	0,0002
BMP 24µg vs. VEGF 1,5µg	4322	1338 to 7307	Yes	***	0,0002
BMP 24µg vs. VEGF 6µg	3686	239,6 to 7132	Yes	*	0,0229
BMP 24µg vs. Kombi 1.5+24µg	-991,6	-3976 to 1993	No	ns	>0,9999
BMP 24µg vs. Kombi 6+24µg	-362,4	-3347 to 2622	No	ns	>0,9999
BMP 24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-2544	-5402 to 313,2	No	ns	0,154
BMP 24µg vs. Kombi 6+48µg	-3251	-6108 to - 393,3	Yes	*	0,0102
BMP 24µg vs. Blank	4402	1418 to 7387	Yes	***	0,0001
BMP 48µg vs. BMP 96µg	-2943	-5801 to - 85,86	Yes	*	0,0359
BMP 48µg vs. VEGF 0,24µg	5511	2654 to 8369	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. VEGF 1,5µg	5531	2674 to 8389	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. VEGF 6µg	4895	1558 to 8231	Yes	***	0,0001
BMP 48µg vs. Kombi 1.5+24µg	217	-2640 to 3075	No	ns	>0,9999
BMP 48µg vs. Kombi 6+24µg	846,2	-2011 to 3704	No	ns	>0,9999

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significant</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
BMP 48µg vs. Kombi 1.5+48µg	-1336	-4060 to 1389	No	ns	0,9964
BMP 48µg vs. Kombi 6+48µg	-2042	-4767 to 682,4	No	ns	0,4863
BMP 48µg vs. Blank	5611	2754 to 8469	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 0,24µg	8454	5470 to 11439	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 1,5µg	8474	5490 to 11459	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 6µg	7838	4392 to 11284	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. Kombi 1.5+24µg	3160	175,8 to 6145	Yes	*	0,0258
BMP 96µg vs. Kombi 6+24µg	3790	805 to 6774	Yes	**	0,0019
BMP 96µg vs. Kombi 1.5+48µg	1608	-1250 to 4465	No	ns	0,962
BMP 96µg vs. Kombi 6+48µg	901,2	-1956 to 3759	No	ns	>0,9999
BMP 96µg vs. Blank	8554	5570 to 11539	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. VEGF 1,5µg	20	-2965 to 3005	No	ns	>0,9999
VEGF 0,24µg vs. VEGF 6µg	-616,5	-4063 to 2830	No	ns	>0,9999
VEGF 0,24µg vs. Kombi 1.5+24µg	-5294	-8279 to -2309	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 6+24µg	-4665	-7649 to -1680	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-6847	-9704 to -3989	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 6+48µg	-7553	-10411 to -4696	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Blank	100	-2885 to 3085	No	ns	>0,9999
VEGF 1,5µg vs. VEGF 6µg	-636,5	-4083 to 2810	No	ns	>0,9999
VEGF 1,5µg vs. Kombi 1.5+24µg	-5314	-8299 to -2329	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Kombi 6+24µg	-4685	-7669 to -1700	Yes	****	<0,0001

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significant</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
VEGF 1,5µg vs. Kombi 1.5+48µg	-6867	-9724 to -4009	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Kombi 6+48µg	-7573	-10431 to -4716	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Blank	80	-2905 to 3065	No	ns	>0,9999
VEGF 6µg vs. Kombi 1.5+24µg	-4677	-8124 to -1231	Yes	***	0,0006
VEGF 6µg vs. Kombi 6+24µg	-4048	-7495 to -602	Yes	**	0,0065
VEGF 6µg vs. Kombi 1.5+48µg	-6230	-9567 to -2893	Yes	****	<0,0001
VEGF 6µg vs. Kombi 6+48µg	-6937	-10274 to -3600	Yes	****	<0,0001
VEGF 6µg vs. Blank	716,5	-2730 to 4163	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 6+24µg	629,2	-2355 to 3614	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-1553	-4410 to 1305	No	ns	0,9775
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 6+48µg	-2259	-5117 to 598,3	No	ns	0,364
Kombi 1.5+24µg vs. Blank	5394	2409 to 8379	Yes	****	<0,0001
Kombi 6+24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-2182	-5039 to 675,6	No	ns	0,4427
Kombi 6+24µg vs. Kombi 6+48µg	-2888	-5746 to -30,89	Yes	*	0,0444
Kombi 6+24µg vs. Blank	4765	1780 to 7749	Yes	****	<0,0001
Kombi 1.5+48µg vs. Kombi 6+48µg	-706,5	-3431 to 2018	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+48µg vs. Blank	6947	4089 to 9804	Yes	****	<0,0001
Kombi 6+48µg vs. Blank	7653	4796 to 10511	Yes	****	<0,0001
13 Wochen					
BMP 24µg vs. BMP 48µg	1173	-1552 to 3897	No	ns	0,9998
BMP 24µg vs. BMP 96µg	-1294	-4019 to 1430	No	ns	0,9982

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significant</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
BMP 24µg vs. VEGF 0,24µg	7319	4594 to 10043	Yes	****	<0,0001
BMP 24µg vs. VEGF 1,5µg	7135	4410 to 9859	Yes	****	<0,0001
BMP 24µg vs. VEGF 6µg	6962	4237 to 9687	Yes	****	<0,0001
BMP 24µg vs. Kombi 1.5+24µg	1211	-1514 to 3935	No	ns	0,9996
BMP 24µg vs. Kombi 6+24µg	665,5	-2059 to 3390	No	ns	>0,9999
BMP 24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-450,7	-3308 to 2407	No	ns	>0,9999
BMP 24µg vs. Kombi 6+48µg	-599	-3324 to 2126	No	ns	>0,9999
BMP 24µg vs. Blank	7111	4386 to 9835	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. BMP 96µg	-2467	-5191 to 257,7	No	ns	0,1333
BMP 48µg vs. VEGF 0,24µg	6146	3422 to 8871	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. VEGF 1,5µg	5962	3238 to 8687	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. VEGF 6µg	5790	3065 to 8514	Yes	****	<0,0001
BMP 48µg vs. Kombi 1.5+24µg	38,33	-2686 to 2763	No	ns	>0,9999
BMP 48µg vs. Kombi 6+24µg	-507	-3232 to 2218	No	ns	>0,9999
BMP 48µg vs. Kombi 1.5+48µg	-1623	-4481 to 1234	No	ns	0,9564
BMP 48µg vs. Kombi 6+48µg	-1772	-4496 to 953	No	ns	0,7991
BMP 48µg vs. Blank	5938	3213 to 8663	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 0,24µg	8613	5888 to 11338	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 1,5µg	8429	5705 to 11154	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. VEGF 6µg	8256	5532 to 10981	Yes	****	<0,0001
BMP 96µg vs. Kombi 1.5+24µg	2505	-219,4 to 5230	No	ns	0,116

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significance</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
BMP 96µg vs. Kombi 6+24µg	1960	-764,7 to 4684	No	ns	0,5842
BMP 96µg vs. Kombi 1.5+48µg	843,6	-2014 to 3701	No	ns	>0,9999
BMP 96µg vs. Kombi 6+48µg	695,3	-2029 to 3420	No	ns	>0,9999
BMP 96µg vs. Blank	8405	5680 to 11129	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. VEGF 1,5µg	-183,8	-2908 to 2541	No	ns	>0,9999
VEGF 0,24µg vs. VEGF 6µg	-356,7	-3081 to 2368	No	ns	>0,9999
VEGF 0,24µg vs. Kombi 1.5+24µg	-6108	-8832 to -3383	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 6+24µg	-6653	-9378 to -3929	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-7769	-10627 to -4912	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Kombi 6+48µg	-7918	-10642 to -5193	Yes	****	<0,0001
VEGF 0,24µg vs. Blank	-208,2	-2933 to 2516	No	ns	>0,9999
VEGF 1,5µg vs. VEGF 6µg	-172,8	-2897 to 2552	No	ns	>0,9999
VEGF 1,5µg vs. Kombi 1.5+24µg	-5924	-8649 to -3199	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Kombi 6+24µg	-6469	-9194 to -3745	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Kombi 1.5+48µg	-7586	-10443 to -4728	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Kombi 6+48µg	-7734	-10458 to -5009	Yes	****	<0,0001
VEGF 1,5µg vs. Blank	-24,33	-2749 to 2700	No	ns	>0,9999
VEGF 6µg vs. Kombi 1.5+24µg	-5751	-8476 to -3027	Yes	****	<0,0001
VEGF 6µg vs. Kombi 6+24µg	-6297	-9021 to -3572	Yes	****	<0,0001
VEGF 6µg vs. Kombi 1.5+48µg	-7413	-10270 to -4555	Yes	****	<0,0001
VEGF 6µg vs. Kombi 6+48µg	-7561	-10286 to -4836	Yes	****	<0,0001

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significant</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
VEGF 6µg vs. Blank	148,5	-2576 to 2873	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 6+24µg	-545,3	-3270 to 2179	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-1662	-4519 to 1196	No	ns	0,9403
Kombi 1.5+24µg vs. Kombi 6+48µg	-1810	-4534 to 914,7	No	ns	0,7592
Kombi 1.5+24µg vs. Blank	5900	3175 to 8624	Yes	****	<0,0001
Kombi 6+24µg vs. Kombi 1.5+48µg	-1116	-3974 to 1741	No	ns	>0,9999
Kombi 6+24µg vs. Kombi 6+48µg	-1265	-3989 to 1460	No	ns	0,9989
Kombi 6+24µg vs. Blank	6445	3720 to 9170	Yes	****	<0,0001
Kombi 1.5+48µg vs. Kombi 6+48µg	-148,3	-3006 to 2709	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+48µg vs. Blank	7561	4704 to 10419	Yes	****	<0,0001
Kombi 6+48µg vs. Blank	7710	4985 to 10434	Yes	****	<0,0001

Tabelle 6: Zwei-Wege-ANOVA-Analyse, Sidak's multiple comparisons test im Zeitintervall 4 bis 13 Wochen. ns nicht signifikant, * signifikant

	<i>Mean Difference</i>	<i>95% Confidence Interval of Difference</i>	<i>Significant</i>	<i>Summary</i>	<i>Adjusted P Value</i>
4 Wochen - 13 Wochen					
BMP 24µg	-2993	-5418 to -568,7	Yes	**	0,006
BMP 48µg	-612,2	-2924 to 1700	No	ns	0,9985
BMP 96µg	-135,6	-2560 to 2289	No	ns	>0,9999
VEGF 0,24µg	22,97	-2402 to 2448	No	ns	>0,9999
VEGF 1,5µg	-180,9	-2605 to 2244	No	ns	>0,9999
VEGF 6µg	282,8	-2549 to 3114	No	ns	>0,9999
Kombi 1.5+24µg	-790,9	-3215 to 1634	No	ns	0,9908
Kombi 6+24µg	-1965	-4390 to 459,2	No	ns	0,2072
Kombi 1.5+48µg	-899,7	-3324 to 1525	No	ns	0,9751
Kombi 6+48µg	-341,5	-2653 to 1970	No	ns	>0,9999
Blank	-285,2	-2710 to 2139	No	ns	>0,9999

7 Literaturverzeichnis

- Albrektsson T, Johansson C (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *J Eur Spine* 10(2), 96–101
- Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, Marcucio R, Miclau T, Healy K, Bahney C (2016): Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *J Bone* 83, 197–209
- Backhaus S, Annen T, Epple M (2013): A porous pH-stabilized compositematerial consisting of poly (D,L-lactide), calcium carbonate and gentamicin for bone substitution. *Materialwiss Werkst* 44, 107–111
- Baldini N, de Sanctis M, Ferrari M (2011): Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater* 27(1), 61–70
- Basmanav F, Kose G, Hasirci V (2008): Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29, 4195–4204
- Bayer EA, Gottardi R, Fedorchak MV, Little SR (2015): The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *J Control Release* 219, 129–40
- Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G (1995): Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 16, 25–31
- Biberthaler P, van Griensven M: *Knochendefekte und Pseudarthrosen*. Springer Verlag Deutschland, Berlin 2017
- Black CRM, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare RS, Oreffo ROC (2015): Bone Tissue Engineering. *J Curr Mol Biol Rep* 1(3), 132–40
- Borselli C, Ungaro F, Oliviero O, d'Angelo I, Quaglia F, la Rotonda MI, Netti PA (2010): Bioactivation of collagen matrices through sustained VEGF release from PLGA microspheres. *J Biomed Mater Res A* 92, 94–102
- Cankaya AB, Erdem MA, Isler SC, Demircan S, Soluk M, Kasapoglu C, Oral CK (2011): Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in an experimental rat model. *Int J Med Sci* 8, 667–72
- Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014): Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93, 335–45

-
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002): Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone & Mineral Research* 17(3), 513–20
- Cui Q, Dighe AS, Irvine JNJ (2013): Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering. *J Curr Pharm Des* 19, 3374–83
- De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, Hernández A, Schulz-Siegmund M, Pec MK, Delgado A, Evora C (2009): VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur J Pharm Biopharm* 73, 50–58
- De Long WGJ, 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(3), 649–58
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545–53
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV (2011): Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 42, 3–15
- Drake CJ, Wessels A, Trusk T, Little CD (2006): Elevated vascular endothelial cell growth factor affects mesocardial morphogenesis and inhibits normal heart bending. *J Dev Dyn* 1, 10–18
- Egol KA, Nauth A, Lee M, Pape HC, Watson JT, Borrelli JJ (2015): Bone Grafting: Sourcing, Timing, Strategies, and Alternatives. *J Orthop Trauma* 29(12), 10–14
- Elliot Carlisle E, Fischgrund JS (2005): Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J* 5, 240–49
- Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, v. 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. *J Orthop Ihre Grenzgeb* 143(6), 660–68
- Fan L, Li J, Dang X, Wang K (2014): The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *J Biomed Res Int* 239356
- Fillingham Y, Jacobs J (2016): Bone grafts and their substitutes. *J Bone Joint* 98, 6–9
- Finkemeier CG (2002): Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84, 454–64

-
- Geiger F, Lorenz H, Xu W, Szalay K, Kasten P, Claes L, Augat P, Richter W (2007): VEGF producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute. *Bone* 41, 516–22
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003): Fracture healing as a postnatal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88(5), 873–84
- Geuze RE, Theyse LF, Kempen DH, Hazewinkel HA, Kraak HY, Oner FC, Dhert WJ, Alblas J (2012): A differential effect of bone morphogenetic protein-2 and vascularendothelial growth factor release timing on osteogenesis at ectopic and orthotopic sites in a large-animal model. *Tissue Eng Part A* 18, 2052–62
- Giannoudis PV, Einhorn TA (2009): Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40, 1–3
- Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM, Stegenda B, Bos RR (2008): The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res* 87, 1048–52
- Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M, El Haj A, Shakesheff KM, Oreffo RO (2014): Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *J Eur Cell Mater* 28, 166–208
- Gradinger R, Gollwitzer H: *Ossäre Integration*. 1. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006
- Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E (2010): Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *J Expert Opin Biol Ther* 10(6), 885–90
- Green E, Lubahn JD, Evans J (2005): Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *J Surgical Orthopaedic Advances* 14(2), 64–72
- Hannik G, Arts JJ (2011): Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury* 42(2), 22–5
- Hashimoto K, Arai Y, Iwai K, Araki M, Kawashima S, Terakado M (2003): A comparison of a new limited cone beam computed tomography machine for dental use with a multidetector row helical CT machine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95, 371–77
- Hernández A, Reyes R, Sánchez E, Rodríguez-Èvora M, Delgado A, Èvora C (2012): In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system. *J Biomed Mater Res A* 100, 2382–91

-
- Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, Yang XB (2010): Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Pt B Rev* 16, 263–71
- Hu K, Olsen BR (2017): Vascular endothelial growth factor control mechanism in skeletal growth and repair. *J Dev Dyn* 246(4), 227–34
- Jahan K, Tabrizian M (2016): Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. *J Biomater Sci* 4(1), 25–39
- Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005
- Kanczler J, Ginty P, White L, Howdle S, Shakesheff K, Oreffo R (2010): The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31(6), 1242–1250
- Kandziora F, Bail H, Schmidmaier G, Schollmeier G, Scholz M, Knispel C, Hiller T, Pflugmacher R, Mittlmeier T, Raschke M, Haas NP (2002): Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 97, 40–48
- Kanematsu A, Yamamoto S, Ozeki M, Nopguchi T, Kanatani I, Ogawa O, Tabata Y (2004): Collagenous matrices as release carriers of exogenous growth factors. *Biomaterials* 25, 4513–20
- Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJ (2009): Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30, 2816–25
- Kempen DH, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert WJ (2010): Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16(6), 551–66
- Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS (2008): Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 39(2), 45–57
- Khan SN, Lane JM (2004): Spinal fusion surgery: animal models for tissue-engineered bone constructs. *Biomaterials*. *Biomaterials* 25, 1475–85
- Kon T, Cho TJ, Aizawa T (2001): Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone & Mineral Research* 16(6), 1004–14
- Kröpil P, Riegger C, Rubbert C, Lanzmann RS, Miese FR, Hakimi AR, Jungbluth P, Becker J, Hakimi M, Antoch G, Scherer A (2012): Quantitative Messung der Knochendefektheilung mittels Digitaler Volumetomographie (DVT) am Tiermodell. *Fortschr Röntgenstr* 184, 404

-
- Lane JM, Tomin E, Bostrom MP (1999): Biosynthetic bone grafting. *J Clin Orthop Relat Res* 367, 107–17
- Laurencin C, Ashe K, Henry N, Kan H, Lo K (2014): Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications. *Drug Discov Today* 19, 794–800
- Lee SK, Lorenzo J (2006): Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 18(4), 411–8
- Li G, Corsi-Payne K, Zheng B, Usas A, Peng H, Huard J (2009): The dose of growth factors influences the synergistic effect of vascular endothelial growth factor on bone morphogenetic protein 4-induced ectopic bone formation. *Tissue Eng Part B* 15(8), 2123–33
- Lohse N, Moser N, Backhaus S, Annen T, Epple M, Schliephake H (2015): Continuous delivery of rhBMP2 and rhVEGF165 at a certain ratio enhances bone formation in mandibular defects over the delivery of rhBMP2 alone - an experimental study in rats. *J Control Release* 220, 201–9
- Lüllmann-Rauch R: *Histologie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2006
- Marsell R, Einhorn TA (2011): The biology of fracture healing. *Injury* 42(6), 551–55
- Meinig RP (2010): Clinical use of resorbable polymeric membranes in the treatment of bone defects. *J Orthop Clin North Am* 41(1), 39–47
- Molen AD (2010): Considerations in the use of cone-beam computed tomography for buccal bone measurements. *Am J Orthod Dentofac* 137, 130–35
- Montazerian M, Dutra Zanotto E (2016): History and trends of bioactive glass-ceramics. *J Biomed Mater Res* 104(5), 1231–49
- Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001): Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 71(6), 354–61
- Moser N, Goldstein J, Kauffmann P, Epple M, Schliephake H (2018): Experimental variation of the level and the ratio of angiogenic and osteogenic signaling affects the spatiotemporal expression of bone-specific markers and organization of bone formation in ectopic sites. *Clin Oral Investig* 22(3), 1223–34
- Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M (1999): Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Max Surg* 3, 232–37
- Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO (2010): The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B* 16, 123–145

-
- Noshi T, Yoshikawa T, Ikeuchi M, Dohi Y, Ohgushi H, Horiuchi K, Sugimura M, Ichijima K, Yonemasu K (2000): Enhancement of the in vivo osteogenic potential of marrow/hydroxyapatite composites by bovine bone morphogenetic protein. *J Biomed Mater Res* 4, 621–630
- Patel ZS, Yuong 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, 931–40
- 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, 2017–27
- Perez R, Kim H (2015): Core-shell designed scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Acta Biomater* 21, 2–19
- Piatelli A, Podda G, Scarano A (1997): Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials* 18(8), 623–27
- Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S (2014): A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *J Biomed Res Int* 348635
- Prub A, Katthagen BD (2008): Musculoskeletal tissue banks. Legal foundations and graft safety. *Orthopäde* 37(8), 749–55
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Richardson T, Peters M, Ennett A, Mooney D (2001): Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 1029–1034
- Rueger JM: *Knochenersatzmittel (Hefte zur Unfallheilkunde)*. Springer-Verlag, Berlin, New York 1992
- Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami N, Nawata M, Kojima S, Nozaki K, Takaoka K (2003): Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* 4, 381–86
- Santos MI, Reis RL (2010): Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 10, 12–27
- Schiller C, Rasche C, Wehmöller M, Beckmann F, Eufinger H, Epple M, Weihe S (2004): Geometrically structured implants for cranial reconstruction made of biodegradable polyesters and calcium phosphate/calcium carbonate. *Biomaterials* 25, 1239–47

-
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-imageanalysis. *Nat Methods* 9, 676–82
- Schliephake H (2002): Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Max Surg* 31, 469–84
- Schliephake H (2010): Application of bone growth factors-the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14(1), 17–22
- Schliephake H, Weich HA, Schulz J, Gruber RM (2007): In vitro characterization of a slow release system of polylactic acid and rhBMP2. *J Biomed Mater Res* 83, 455–462
- 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(2), 133–41
- Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009): Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications. *Unfallchirurg* 112(9), 785–94
- Schmitt C, Lutz R, Doering H, Lell M, Ratky J, Schlegel KA (2013): Bio-Oss® blocks combined with BMP-2 and VEGF for the regeneration of bony defects and vertical augmentation. *Clin Oral Implan Res* 24, 450–60
- Speckmann E-J: Physiologie. 5. Auflage; Urban&Fischer, München 2008
- Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV, 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, 9656–61
- Summers RB (1994): A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique. *15(2)*, 152, 154–6, 158
- Sundelacruz S, Kaplan DL (2009): Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol* 20, 646–55
- Takaoka K, Koezuka H, Nakahara H (1991): Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9, 902-07
- Terakado M, Hashimoto K, Arai Y, Honda M, Sekiwa T, Sato H (2000): Diagnostic imaging with newly developed ortho cubic super-high resolution computed tomography (Ortho-CT). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89, 509–18
- Towfigh H, Hiemer R, Langer M, Friedel R: Handchirurgie. Band 2; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2011

-
- Tschakaloff A, Von Oepen R, Seibt S, Vieting M (1996): Das Begasungsverfahren zur Beladung resorbierbarer Polymere mit thermolabilen Substanzen. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 20, 47–50
- Valderrabano V, Engelhardt M, Küster H-H: *Fuß & Sprunggelenk und Sport*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2009
- Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, Gross G, Weich HA, Rinas U (2002): Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2, 185–94
- Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F (2014): Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth F R* 25, 1–19
- Wan M, Shi X, Feng X, Cao X (2001): Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 276(13), 10119–25
- Welsch U: *Lehrbuch der Histologie*. 2. Auflage; Urban&Fischer, München 2006
- Wippermann BW, Schrott HE, Steeg S, Tscherne H (1997): Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1191 cases. *Chirurg* 68(12), 1286–91
- Wu M, Chen G, Li Y-P (2016): TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *J Bone Res* 4, 16009
- Xiao C, Zhou H, Liu G, Zhang P, Fu Y, Gu P, Hou H, Tang T, Fan X (2011): Bone marrow stromal cells with a combined expression of BMP-2 and VEGF-165 enhanced Bone regeneration. *J Biomed Mater* 6, 015013
- Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A (2007): Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *J Bone* 41(6), 928–36
- Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Baggett LS, Ueda H, Tabata Y, Jansen JA, Wong M, Mikos AG (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, 2347–62
- Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RG, Uth N (2015): Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review. *J Biomed Mater Res A* 103, 2460–81
- Zhang C (2010): Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg Res* 5, 37

Zhang W, Wang X, Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, Zeng D, Chen J, Zhang Z, Kaplan DL, Jiang X (2011): The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF(165) and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. *Biomaterials* 32, 9415–24

Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A (2016): Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 122(4), 392–402