

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Wirksamkeit
wachstumsfaktorspezifischer Plasmide zur Förderung der
Knochenregeneration mittels non-viralem Vektor in vivo –
eine experimentelle Studie an der Ratte**

Dr. med. dent. Jochen Weitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. A. Kolk
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 03.06.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenheilung	1
1.2	Möglichkeiten zur Rekonstruktion von Knochendefekten	3
1.2.1	Knochenersatzmaterial	3
1.2.1.1	Autolog	3
1.2.1.2	Allogen	3
1.2.1.3	Xenogen	4
1.2.1.4	Alloplastisch	4
1.2.2	Wachstumsfaktoren	4
1.2.2.1	Bone Morphogenetic Protein (BMP)	5
1.2.2.2	Trägersubstanz	6
1.2.3	Gentransfer	7
1.2.3.1	Viraler Gentransfer	8
1.2.3.2	Non-viraler Gentransfer	9
2	Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit	11
3	Material und Methode	13
3.1.1	Aufbau und Einteilung	13
3.1.2	Trägermaterial	14
3.1.3	Trägerimplantat	15
3.1.4	Haltung und Ernährung	15
3.1.5	Operationstechnik	16
3.1.6	Postoperative Versorgung	16
3.1.7	Euthanasie und Präparation	18
3.1.8	Herstellung der Schnitte	18
4	Ergebnisse	22
5	Diskussion	34
6	Zusammenfassung	46
7	Literaturverzeichnis	48
8	Abbildungsverzeichnis	65

9	Tabellenverzeichnis	66
10	Abkürzungsverzeichnis	67
11	Danksagung	68
12	Curriculum vitae	69

1 Einleitung

Die Regeneration von knöchernen Defekten stellt eine große Herausforderung in Orthopädie sowie Cranio-Maxillo-Fazialer Chirurgie dar. Bei Überschreitung einer kritischen Defektgröße oder Kompromittierung der Knochenregeneration durch mechanische oder metabolische Faktoren muss oft knöchern rekonstruiert werden [Meyer 2006]. Ursache für Knochendefekte können neben ausgedehnten Entzündungen, Traumata oder deren Folgen auch Tumoren der Mundhöhle oder des Knochens sein [Schieker 2006]. Auch Bestrahlungsfolgen nach Tumorerkrankungen in Form einer Osteoradionekrose oder die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose (BAK) stellen ein zunehmendes Problem dar. Beim Ersatz dieser Defekte stellt die Rekonstruktion mittels autologem Knochen nach wie vor den Goldstandard dar [Gamradt 2003, Li 2007, Sailer 2000, Torroni 2007, Valentini 2007]. Dieser wird am häufigsten aus dem Beckenkamm, dem Unterschenkel oder auch intraoral (Kieferwinkel, Tuber- oder Kinnregion) entnommen. Bei langstreckigen Defekten sind hierfür oft die Mitnahme eines Gefäßstiels und der mikrovaskuläre Anschluss des Transplantats notwendig, um die Sicherheit der Einheilung zu erhöhen. Gerade im letzteren Fall kann durch die Entnahmemorbidität ein nicht unerheblicher Dyskomfort für den Patienten entstehen [Baqain 2009, Becker 2011, Cricchio 2003, Kager 2006, Nkenke 2004, Pollock 2008, Rawashdeh 2008, Schaaf 2010]. Aus diesem Grund ist man bemüht, Alternativen zum autologen Knochenersatz zu finden.

1.1 Knochenheilung

Als eines der wenigen Gewebe des menschlichen Körpers ist der Knochen prinzipiell zu einer vollständigen Regeneration, einer sogenannten Restitutio ad integrum, fähig. Sowohl bei der Knochenheilung als auch der Einheilung eines Implantats, Transplantats oder einer Osteosynthese sind die Vorgänge der Osteoinduktion und der Osteokonduktion von entscheidender Bedeutung:

Bei der Osteoinduktion handelt es sich um die Induktion der Osteogenese [Wilson-Hench 1987]. Dieses Phänomen kann normalerweise bei jeglicher Art der Knochenheilung beobachtet werden. Es impliziert die Anlockung unreifer Zellen aus dem umliegenden Gewebe und deren Stimulation zur Differenzierung in Präosteoblasten, welche im Verlauf zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Gerade bei der Frakturheilung ist ein Großteil der Regeneration von der Osteoinduktion abhängig

[Albrektsson 2001]. Entscheidender Faktor für die Osteoinduktion ist der Wachstumsfaktor bone morphogenetic protein (BMP), vor allem der Subtyp BMP-2 [Hanseler 2012]. Hierauf wird im Abschnitt 1.3 (Wachstumsfaktoren) noch genauer eingegangen.

Die Osteokonduktion beschreibt das Wachsen von Knochengewebe und die Verteilung potentieller Vorläuferzellen auf einer Oberfläche [Albrektsson 2001, Marx 1998]. Eine osteokonduktive Oberfläche erlaubt umliegendem Gewebe, Kapillaren und Osteoprogenitorzellen das Einwachsen in Poren oder Kanäle des Implantats [Masuda 1998]. Die Osteokonduktion kann nur nach erfolgreicher Osteoinduktion stattfinden und benötigt eine ausreichende Blutzufuhr. Sobald die Oberfläche mit Blut in Kontakt gekommen ist, beginnen Zellen mit der Migration, welche eine Kontraktion des Fibringerinnsels nach sich zieht. Sobald die Zellen ausdifferenziert sind, stellen sie die Migration ein und beginnen, Osteoid zu produzieren [Davies 1998].

Im Verlauf der Knochenregeneration sind vor allem drei Parameter von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Heilung: Ausmaß des Defektes, mechanische Stabilität und Qualität des umliegenden Knochenlagers bzw. der Weichteile. Übersteigen diese Parameter gewisse Grenzen, kann keine Restitutio ad integrum stattfinden. Selbst gut adaptierte bzw. nicht dislozierte Frakturen heilen beispielsweise nicht aus, wenn keine ausreichende Stabilität gewährleistet ist. Auch ein durch Entzündungen, Vernarbungen – etwa durch Voroperationen - oder Bestrahlung geschädigtes umliegendes Weichgewebe kann die Heilung verhindern. Bleiben Knochenheilung aus und ein Defekt bestehen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, diesen zu rekonstruieren; die folgenden Absätze geben einen Überblick über den aktuellen Stand von Wissenschaft und Forschung.

1.2 Möglichkeiten zur Rekonstruktion von Knochendefekten

1.2.1 Knochenersatzmaterial

1.2.1.1 Autolog

Autologes Knochenersatzmaterial, d.h. Material, bei dem Spender und Empfänger dieselbe Person sind, kann beim Menschen extra- und intraoral entnommen werden. Extraoral kommen als Spendeareal der Beckenkamm, die Scapula und die Fibula in Frage. Am Beckenkamm kann neben reiner Spongiosa ein mono- oder bikortikaler Knochenspan entnommen und avaskulär transplantiert werden, wohingegen bei langstreckigen Defekten Beckenkamm, Fibula oder Scapula meist mit versorgendem Gefäßstiel entnommen und anschließend mikrovaskulär anastomosiert werden. Intraoral stehen als Spenderegion v.a. Ramus- oder Tuberbereich sowie Kinnregion zur Verfügung.

Autologer Knochen hat osteokonduktive wie osteoinduktive Eigenschaften. Die Gewinnung der Transplantate ist jedoch immer mit einer mehr oder weniger hohen Entnahmemorbidität vergesellschaftet. Gerade bei periimplantären Knochenaufbauplastiken ist die Tendenz erkennbar, Knochentransplantate durch Differenzierungsfaktoren wie Bone morphogenetic proteins (BMPs; s.u.) in Kombination mit Trägermaterialien zu ergänzen bzw. komplett durch BMPs zu ersetzen [Terheyden 1999].

1.2.1.2 Allogen

Als allogene Knochenersatzmaterialien stehen gefriergetrockneter Bankknochen (FDBA=freeze-dried bone allograft) und demineralisierter gefriergetrockneter Bankknochen (DFDBA= demineralized freeze-dried bone allograft) zur Verfügung. Neben der osteokonduktiven Wirkung besitzt allogener Knochen auch eine osteoinduktive Wirkung, die allerdings erheblichen Schwankungen ausgesetzt sein kann, selbst innerhalb einer Knochenbank. Außerdem ist diese Art des Knochenersatzmaterials mit dem Risiko behaftet, Infektionen mit HIV oder der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung hervorzurufen [Buck 1989, Tomford 1995]. Auch unerwünschte Immunreaktionen sind nicht völlig auszuschließen [Cochran 1999, De Long 2007, Giannoudis 2005, Reynolds 2003, Trombelli 2002].

1.2.1.3 Xenogen

Bei den sog. Xenografts handelt es sich z.B. um chemisch behandelten, vollständig anorganischen bovinen Knochen (Bio-Oss) oder Calciumcarbonat aus Korallen (Coralline). Ihre Eigenschaften sind im Wesentlichen osteokonduktiv.

1.2.1.4 Alloplastisch

Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind u.a. Polymere, Keramik, beta-Tricalciumphosphat (β -TCP), Hydroxylapatit und bioaktive Gläser: amorphe Partikel aus Calciumphosphaten, Natriumsalzen, Silikon (z.B. PerioGlas). Hierbei dient die osteokonduktive Oberfläche als Leitschiene für Osteoblasten, die sich ansiedeln und das sich auflösende Material resorbieren und durch Knochen ersetzen sollen [Müller 2006].

1.2.2 Wachstumsfaktoren

Der komplexe Vorgang der Knochenheilung wird durch zahlreiche lokal und systemisch wirkende Mechanismen gesteuert. Es sind etliche zeitlich und räumlich begrenzte Interaktionen von Osteoblasten mit der extrazellulären Matrix sowie mit Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren beschrieben [Abe 2000, Abiraman 2002, Akizuki 1997, Alden 1999, Schmidmaier 2004]. Ein Erfolg versprechender Ansatz zur Knochenregeneration besteht in der Anwendung von Wachstumsfaktoren [Baylink 1993, Rasubala 2003, Reddi 2001, Theyse 2006], die seit vielen Jahren im Mittelpunkt der Forschung der Geweberegeneration stehen. Wachstumsfaktoren sind wichtige Steuerelemente des Knochenzellmetabolismus. In zahlreichen in vitro- und in vivo-Studien konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Wachstumsfaktoren in der Lage sind, das Knochenwachstum signifikant zu beschleunigen und stimulierend auf die Heilung des umliegenden Gewebes zu wirken [Akita 2004, Huang 2002, Ido 2005, Liu 2004a, Nakamura 2003, Rasubala 2003, Schmidmaier 2003, Simpson 2006, Würzler 2004]. In den letzten Jahren hat sich die Knochenforschung vor allem auf den Wachstumsfaktor BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) fokussiert, da in Untersuchungen am lebenden Organismus gezeigt werden konnte, dass BMP-2 im Vergleich zu anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ein größeres Potential zur Förderung der Knochenheilung besitzt [Egermann 2006].

1.2.2.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die erstmals 1965 von Marshall Urist entdeckten Wachstumsfaktoren im Knochen wurden als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnet [Urist 1965, Wozney 1988]. Sie gehören zu der gleichen Familie von Zytokinen wie TGF- β 1 und IGF-1 [Rosen 1992]. Sie spielen eine zentrale Rolle im Verlauf der enchondralen Osteogenese und dienen als chemotaktische Botenstoffe für mesenchymale Stammzellen aus dem Markraum [Abe 2000], die zu Osteoblasten differenzieren [Suzawa 1999].



Abbildung 1: 3-Dimensionale Struktur eines BMP-2 Moleküls (Quelle: ProteinDataBank)

Rekombinante, also biotechnologisch hergestellte Wachstumsfaktoren wie BMPs werden in jüngster Zeit experimentell und klinisch zur Regeneration von Zellen und Geweben genutzt. Allerdings ist die Halbwertszeit solcher Wachstumsfaktoren als Teil natürlicher Regulationsmechanismen naturgemäß kurz. Die Biologie und Biokompatibilität rekombinanter Proteine sind Gegenstand intensiver Forschung.

So zeigte der Einsatz von BMPs in vivo bei verschiedenen Tierversuchsmodellen eine Heilung mit beschleunigter Kallusbildung und -reifung [Arosarena 2005, Groeneveld 2000, Hanseler 2012, Schmidmaier 2002, Takahashi 2005a, Würzler 2004, Yamamoto 2006].

Bei ersten Einsätzen in klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass BMP-2 in der Lage ist, die Defektheilung am Knochen zu verbessern [Boden 2002, Boyne 2001, Jones 2006, Swiontkowski 2006, Villavicencio 2005].

Allerdings beschränken die kurze Halbwertszeit von 7-16 Minuten in vivo [Jeon 2007] sowie die Schwierigkeit der Applikation direkt am Wirkort den klinischen Einsatz erheblich [Bonadio 1999, Oberholzer 2006, Weber 2002]. Gerade eine lokale Applikation der Wachstumsfaktoren ist allerdings wünschenswert, um eine Wirkung auf andere nicht osteogene Zellen des Körpers auszuschließen bzw. auf ein Minimum reduzieren zu können [Chen 2010, Luginbuehl 2004, Varkey 2004]. Die schwerwiegendsten Einschränkungen der klinischen Anwendung von rekombinanten Wachstumsfaktoren liegen in der unkontrollierten Knochenneubildung in Verbindung mit mangelnder Vaskularisation. Zudem wird die gentechnische Herstellung durch geringe Produktionsausbeuten bei sehr hohen Kosten erschwert [Kawai 2003]. An Produktion und Anwendung der Wachstumsfaktoren für die humane Anwendung werden hohe Anforderungen gestellt. Zum einen müssen die Wachstumsfaktoren als pharmazeutische Präparate in einer reinen aktiven und sicheren Form vorliegen, zum anderen muss die Biokompatibilität gewährleistet sein. Diese Limitationen erlauben daher mittelfristig keinen breiten klinisch realisierbaren Einsatz.

1.2.2.2 Trägersubstanz

Für die lokale Applikation mit Arzneistoffträgern als zugrunde liegende Matrix sind verschiedene Lösungsansätze beschrieben worden. Dies betrifft Stoffgruppen wie Polylactide [Lamberg 2006, Liu 2006, Schmidmaier 2006a, Wildemann 2005], Kollagen [Dragoo 2005, Dunn 2005, Morin 2006, Premaraj 2005] und Fibrinogen bzw. Fibrinkleber [Patel 2006, Wong 2003] und deren verschiedene Kombinationen untereinander bzw. mit anderen Stoffgruppen [Arnander 2006, Itoh 2005, Kato 2006, Lee 2006, Zhang 2005]. Als Trägersubstanz für bioaktive Wirkstoffe wie Wachstumsfaktoren kommt vor allem PDLLA (Poly-D-L Lactic Acid) in Betracht, da Biokompatibilität und Freisetzungskinetik dieser Substanz den Anforderungen in der rekonstruktiven Chirurgie sehr gut gerecht werden [Raghoobar 2006, Schmidmaier 2006b, Strobel 2011a, Strobel 2011b, Wildemann 2011]. In Vorversuchen von Gollwitzer, Schmidmaier und Co. konnte gezeigt werden, dass die Toxizität und Gewebereaktion vernachlässigbar klein ist [Gollwitzer 2005]. Diese Art von Beschichtung ist stabil und hält auch hohen mechanischen Belastungen stand. Trotz gut entwickelter Trägermaterialien sprechen neben den oben angesprochenen Nebenwirkungen langfristig vor allem auch die Kosten von rekombinanten Proteinen gegen eine Verwendung in der klinischen Routine.

1.2.3 Gentransfer

Dies hat zur Suche nach Alternativen zur Verwendung rekombinanter Wachstumsfaktoren geführt, eine von diesen stellt die Gentherapie dar.

Bereits am 26. Mai 1966 stellte Tatum auf einem Symposium des Columbia University College in New York Konzepte für die Gentherapie am Menschen vor, wobei er Viren als mögliche Trägersysteme nannte [Tatum 1966].

Gentransfer bezeichnet den Transfer von spezifischen Genen in das Erbgut einer Zelle unter Anwendung hochspezifischer gentechnologischer Methoden. Die gentechnisch veränderte Zelle synthetisiert Proteine, die normalerweise entweder gar nicht oder nur in geringen Mengen von dieser Zelle produziert werden [Oberholzer 2006]. Diese Proteine sind in der Lage, intrazelluläre Steuerungsmechanismen zu beeinflussen: sie werden dann an der Zelloberfläche als Rezeptor exprimiert oder als biologisch aktive Mediatoren sezerniert. Große Bedeutung nimmt hier vor allem die direkte Beeinflussung intrazellulärer Steuerungsmechanismen ein, da dies mit konventionell verabreichten Medikamenten schwierig oder überhaupt nicht zu erreichen ist. Da rekombinante Wachstumsfaktoren oral nicht bioverfügbar sind und eine kurze Halbwertszeit besitzen, besteht zur Aufrechterhaltung einer lokal wirksamen Konzentration bisher nur die Möglichkeit der wiederholten lokalen Injektion; hierzu kann die Stimulation von gewebeständigen Zellen mit spezifischen Genen, die den entsprechenden Wachstumsfaktor kodieren, eine alternative Behandlungsmethode darstellen [Oberholzer 2006]. Die Gentherapie ermöglicht die langfristige Synthese und Freisetzung von Proteinen, die normalerweise eine kurze Halbwertszeit haben oder oral nicht applizierbar sind [Knowles 1998, Zhang 1998]. Für diesen als Gentransfer bezeichneten Vorgang benötigt man ein Konstrukt, welches das spezifische Gen trägt, den sog. „Vektor“ [Oberholzer 2006]. Durch einen Promotor wird die durch den Gentransfer eingebrachte Fremd-DNA (Transgen) gelesen und ihre Expression initialisiert [Hannallah 2003, Mulligan 1993]. Bei den Vektoren wird zwischen nicht-viralen und viralen Vektoren unterschieden.

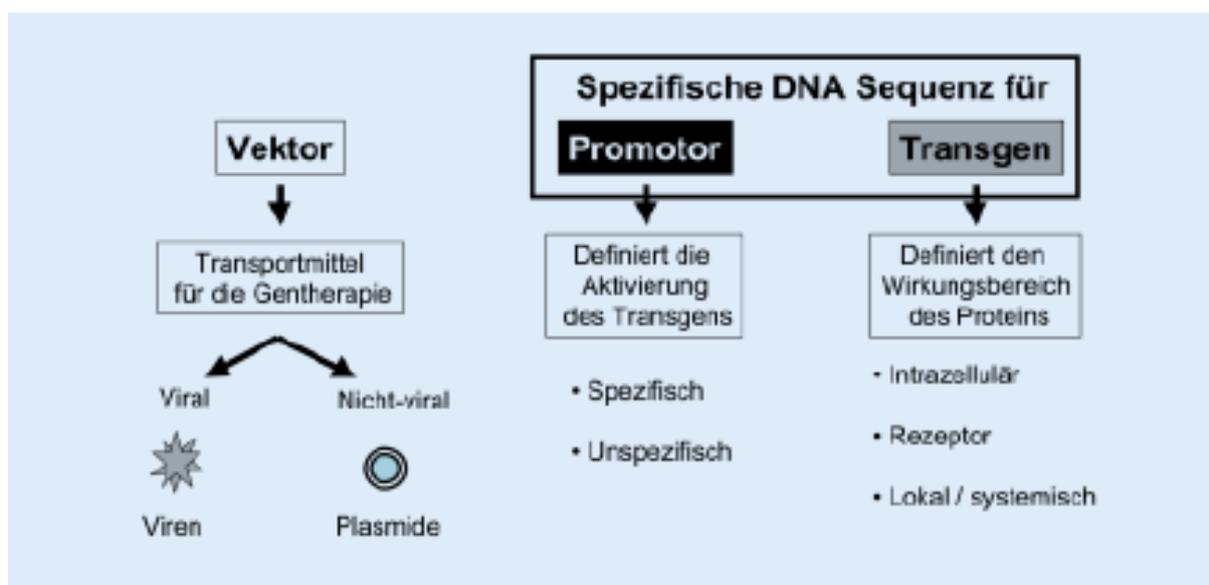


Abbildung 2: Für die Gentherapie werden Vektor und die DNA-Sequenzen von Promotor bzw. Transgen benötigt [Oberholzer 2006]

Vektor		Vorteile	Nachteile
Nicht-viral	Direkte DNA-Applikation	Geringer technischer Aufwand DNA epichromosomal	Geringe Effizienz Schädigung der Zellmembran
	Liposomen	Einfach herzustellen	Schlechte Transfektionseffizienz
Viral	Adenovirus	Hohe Effizienz bei nicht proliferierenden Zellen Transiente Expression DNA epichromosomal	Entzündungsfördernd
	Adenoassoziierte Viren	Hohe Effizienz bei proliferierenden Zellen Längere transiente Expression Nicht pathogen oder toxisch Integration in das Wirtsgenom	Nur kleine DNA-Sequenzen können eingeschleust werden
	Retroviren	Nur proliferierende Zellen werden infiziert Stabile Genexpression Integration in das Wirtsgenom	Mutationsgefahr HIV-Infektion möglich

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der am häufigsten verwendeten Vektoren [Oberholzer 2006]

1.2.3.1 Viraler Gentransfer

Als sehr effektiv haben sich die viralen Vektoren herausgestellt, da das Einschleusen von genetischem Material in die Ziel- oder Wirtszelle essentieller Bestandteil des viralen Lebenszyklus ist. Mit der Verwendung von Viren als Vektoren nutzt man ihre evolutionär erworbene Fähigkeit, Gene in Wirtszellen einzubringen [Oberholzer 2006]. Die am häufigsten verwendeten Viren für diesen Zweck sind Adenoviren und

Retroviren, die zusammen aktuell etwa die Hälfte der verwendeten Vektoren in klinischen Gentherapie-Studien stellen [Wiley 2008].

Bei Retroviren wird das Genom in die Erbsubstanz des Wirtes eingebaut. Die neue Information wird somit bei Teilungsvorgängen der Zelle weitergegeben. Dies eröffnet bei Einsatz von Retroviren Vorteile für die Gentherapie chronischer Krankheiten. Zur Vektorherstellung werden diejenigen Gene aus dem Genom entfernt, welche die Virusreplikation regulieren. Somit verlieren die Viren ihre Teilungsfähigkeit. Zusätzlich werden für Vektoren der neuen Generation diejenigen Gene eliminiert, die für die virale Immunantwort verantwortlich sind. Durch das Einsetzen eines „Therapiegens“ (Transgen) in die frei gewordenen Bereiche entsteht ein sog. „rekombinanter Virus“ [Oberholzer 2006].

Bei Adenoviren wird das Genom dagegen nicht in die DNA der Wirtszelle integriert, sondern in den Zellkern geschleust, wo die DNA dann gelesen und kopiert werden kann. Dadurch kommt es nur zu einer transienten Expression der entsprechenden Information, was zur zeitlichen Limitation des therapeutischen Effekts führt. Dies ist ein Nachteil der Adenoviren. Hinzu kommt die starke Immunantwort, die eine wiederholte Anwendung unmöglich machen kann. Alle viralen Vektoren haben in Abhängigkeit ihres natürlichen Tropismus (d. h. rezeptorvermittelt) eine definierte Spezifität für eine Zielzelle. So zielen Retroviren gemäß ihres natürlichen Tropismus auf Lymphozyten, Adenoviren hingegen vorwiegend auf Endothelzellen. Durch zusätzliche Modifikation der Virushülle kann diese „natürliche“ Spezifität beeinflusst werden. Dieses sog. „Re-Targeting“ von viralen Vektoren wurde bereits bei Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierten Virusvektoren durchgeführt und ermöglicht die Beeinflussung jeder Zelle [Buchholz 1999, Girod 1999, Marcel 1996, Martinek 2002, Seggewiss 2005, Wickham 1995].

1.2.3.2 Non-viraler Gentransfer

Um DNA-Plasmide in die Zielregion zu implantieren, kann man auf verschiedene Methoden zurückgreifen: Dazu gehören beispielsweise direkte Injektion oder oszillierende Tattoo-Nadeln. Alternativ können die Plasmide mit zusätzlichen Penetrationshilfen wie Goldplättchen oder kationischen Liposomen gekoppelt werden [Gao 1991, Klein 1992, Litzinger 1992, Nanney 2000, Palmer 2004, Park 2003, Waterhouse 2005]. Die direkte DNA-Applikation mittels Plasmiden ist wegen ihrer leichten Handhabung technisch einfach durchzuführen, allerdings ist die Effizienz

des direkten DNA-Transfers mit nicht-viralen Vektoren im Vergleich zu viralen Vektoren deutlich geringer [Oberholzer 2006].

Eine viel versprechende Alternative bietet die hier angewandte nicht-virale Gentherapie, bei der Wachstumsfaktoren gezielt vom Körper selbst am Ort des Defektes produziert werden [Hannallah 2003, Oberholzer 2006]. Dies wird durch den Transfer von wachstumsfaktorspezifischen Genen erreicht, die das Erbgut lokaler Zellen vorübergehend so verändern, dass diese den gewünschten Wachstumsfaktor selbst in erforderlichen Mengen produzieren können. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transfektion. Der Vorteil der nicht-viralen Gentherapie gegenüber dem viralen Transfer besteht in der Risikolosigkeit, d.h. in der fehlenden systemischen Ausbreitungsmöglichkeit und in der lediglich transienten, aber positiven Beeinträchtigung des Genoms der Zielzelle. Weiterhin führt die lokale Produktion zur langfristigen Synthese und Freisetzung der Wachstumsfaktoren was zur Aufrechterhaltung einer lokal therapeutisch wirksamen Konzentration führt [Kolk 2006, Oberholzer 2006].

2 Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Regeneration größerer Knochendefekte nach Trauma oder Tumoren sowie die Problematik der Osseointegration dentaler Implantate unter schwierigen Voraussetzungen steht heute im Mittelpunkt der Forschung im Kiefer-Gesichtsbereich. Bei Kontinuitätsdefekten des Unterkiefers ist nach wie vor die autologe Knochentransplantation, meist aus dem Beckenkamm der Goldstandard. Diese Methode zieht trotz der hervorragenden biologischen und mechanischen Eigenschaften des autologen Knochens nicht unerhebliche Entnahmemorbiditäten nach sich, insbesondere bei größeren Defekten und der daraus resultierenden Notwendigkeit eines mikrovaskulären Gefäßanschlusses. Weiterhin ist man bei Verhältnissen, die eine Implantation aufgrund fragwürdigen Erfolgs normalerweise ausschließen, bemüht, durch gezielte Maßnahmen die Regeneration des Knochens zu stimulieren bzw. zu unterstützen. Hauptursachen für ein ersatzschwaches Knochenlager sind Diabetes mellitus, Osteoporose, Osteoradionekrose nach Bestrahlung und die in den letzten Jahren zunehmende Osteochemonekrose, bedingt durch die Einnahme von Bisphosphonaten. Desweiteren stellt die demographische Entwicklung der Bevölkerung ein zusätzliches Problem dar. Gleichzeitig nimmt aber der Wunsch nach optimaler Rehabilitation und dadurch erhöhter Lebensqualität stetig zu. Um diesem Dilemma zu begegnen, werden verschiedene Strategien verfolgt, die alle mehr oder weniger die Knochenregeneration beschleunigen bzw. erst ermöglichen sollen.

Im Rahmen einer viel versprechenden Studie von Kolk et al. [Kolk 2007] konnte mit einem neuen, hinreichend untersuchten nicht-viralen Vektor [Finsinger 2000, Kolk 2011, Scherer 2002], mit dem Plasmide für BMP-2 in vivo übertragen werden, die rasche Abheilung von Critical-size Defekten (s.o.) ermöglicht werden. Damit wurde prinzipiell die praktische Realisierbarkeit ("proof of principle") des Verfahrens an Ratten gezeigt.

Während der Versuche fiel bei Tieren aus der rhBMP-2-Gruppe bei gewissen Wirkstoffkonzentrationen eine überschießende Knochenneubildung weit über das Volumen der ursprünglichen Knochenform auf. Diese wurde im weiteren Verlauf weitestgehend remodelliert. Da diese ausgeprägte Gewebsneubildung metabolisch gravierende Folgen für einen Organismus haben kann, galt es, die Ursachen für dieses Phänomen zu analysieren und die optimale Dosis für die

Wachstumsfaktorapplikation zu finden. Ein möglicher Grund für die überschießende Knochenneubildung könnte die Bildung eines unreifen Osteoids aufgrund zu hoher stimulierender Einflüsse sein, mit der die Gefäßneubildung nicht mithalten kann und es somit mangels Versorgung des neugebildeten Knochens zur Atrophie kommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, ist hier besonders die genauere Analyse folgender Eckpfeiler der Geweberegeneration interessant:

Osteocalcin als Marker für die osteoblastäre Aktivität, CD 68 und TRAP als Marker für die Osteoklastenaktivität und somit indirekt für das Remodelling und 1A4 (smooth muscle actin) als Gefäßmarker als wichtiger Faktor für die Gefäßversorgung und daraus resultierende Dimensionsstabilität des Knochens.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen eignet sich die Technik der Immunhistochemie am besten, da sich hier o. g. Marker quantitativ-morphometrisch erfassen lassen.

3 Material und Methode

Der hierfür angesetzte Tierversuch fand an 6 Monate alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 500g statt. Zur Darstellung der therapeutischen Wirksamkeit einer bioaktiven Implantatoberfläche im zeitlichen Verlauf wurde ein so genanntes orthotopes Tiermodell gewählt. Hierfür wurde zur objektiven Beurteilbarkeit und vor allem Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Beschichtungen ein standardisierter Defekt im Kieferwinkel gesetzt (Critical-size Defekt). Dabei handelt es sich um einen kleinstmöglichen Defekt eines bestimmten Knochens einer Tierart, der ohne äußere Einflüsse keine spontane Heilungstendenz zeigt [Hedner 1995, Schmitz 1986]. In diesem Fall wurde dafür ein kreisrunder Defekt mit einem Durchmesser von 5 mm im Kieferwinkel gesetzt. Dieser Defekt wurde mit einer Titanfolie abgedeckt; die dem Defekt zugewandte Seite wurde mit einer bioaktiven Beschichtung versehen. In Vorversuchen hatte sich dieses Verfahren bereits bewährt [Deppe 2003]. Anzumerken ist, dass die eingesetzten Wachstumsfaktoren auch die umliegenden Gewebe wie Weichgewebe (Muskel) und ortsständigen Knochen mit beeinflussen können.

3.1.1 Aufbau und Einteilung

Der Tierversuch wurde mit insgesamt 4 verschiedenen Gruppen durchgeführt: Für den nichtviralen Gentransfer wurden Titanfolien mit in PDLLA resuspendierter COPROGs-DNA (Copolymer protected Gene Vectors), dem so genannten BMP-2 Plasmid in den Konzentrationen 2,5, 12, 25, 50 und 100 µg beschichtet. Demgegenüber stand eine Gruppe mit in PDLLA resuspendiertem rekombinanten BMP-2 in einer Konzentration von 62,5 µg. Eine weitere Gruppe wurde mit nativem PDLLA beschichtet. Außerdem wurde eine Gruppe mit in PDLLA resuspendierten Luciferase-COPROGs beschichtet. Hiermit kann eine systemische Wirkung nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Eine Gruppe mit unbehandelten Tieren wurde als „Nullprobe“ für die µCT-Untersuchungen verwendet. Auf den Einsatz von völlig unbeschichteten Implantaten konnte hier verzichtet werden, da der fehlende Effekt auf den Knochen bereits in einer voraus gegangenen Studie nachgewiesen wurde [Deppe 2003]. Als Überlebenszeit wurden 7, 14, 28, 56 und 128 Tage gewählt. Nach Opferung der Tiere wurde zunächst ein mikro-CT durchgeführt, bevor die Proben zur feingeweblichen Untersuchung weiterverarbeitet wurden. Neben

mikroradiographischer und fluoreszenzmikroskopischer Analyse wurden die Schnitte histologisch und histomorphometrisch untersucht. Die ausführliche Auswertung dieser Parameter wurde in anderen Arbeiten bereits abgefasst (s.u.), deswegen soll hier nur auf die für diese Arbeit relevanten Gruppen eingegangen werden. Hier kristallisierten sich vor allem die Plasmidgruppe mit 2,5 µg heraus, da diese trotz niedriger Konzentration die beste Regeneration zeigte; sowie zum direkten Vergleich die Gruppe mit rekombinantem Protein rhBMP-2, das zu schnellem und unkontrollierten Knochenwachstum führte, der sich erst im zeitlichen Verlauf zurückbildete. Nach 7 und 14 Tagen waren noch keine ausreichenden Veränderungen am Knochen-Implantat-Interface auszumachen, also wurden die späteren Tötungszeitpunkte ausgewählt. Bei nahezu allen Tieren der beiden Gruppen kam es bereits nach 28 Tagen zu einer kompletten knöchernen Durchbauung des critical size defects - Voraussetzung für die Untersuchung der zentralen Abschnitte des Defekts. Zwischen dem 56. und 112. Tag fanden keine gravierenden Veränderungen mehr statt, so dass sich auf die Überlebenszeiträume von 28 und 56 Tagen beschränkt wurde.

Die radiologischen, mikrocomputertomographischen, histomorphometrischen, konventionell-histologischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen über Quantität und Qualität des neugebildeten Knochens wurden in anderen Arbeiten dargestellt [Bissinger 2011, Stöhrer 2009], so daß sich diese Arbeit vor allem mit immunhistochemischen Fragestellungen beschäftigt.

3.1.2 Trägermaterial

Als Trägermaterial diente das synthetische, kommerziell verfügbare Poly (D,L-Laktid) Resomer® R203 (PDLLA) der Fa. Boehringer Ingelheim® AG mit einem Molekulargewicht von 30 000 Dalton. Alle in vitro-Vorversuche wurden mit der Kaltbeschichtungstechnologie durchgeführt.

Hierzu wurde mit einer konstanten Poly (D,L-Laktid) R 203® Konzentration von 50 mg/ml unter Zusatz von Ethylacetat (Fa. Sigma-Aldrich®, Deisenhofen) als organisches Lösungsmittel gearbeitet. Für den Tierversuch wurde die sog. PDLLA-Lösung steril filtriert (Lösungsmittelbeständiger Sterilfilter mit Porengröße 0,2 µm). Die sterile PDLLA – Lösung wurde zu den lyophilisierten COPROGs hinzugegeben und mit einem eigens hergestellten Homogenisator gleichmäßig und zügig durchmischt. Zunächst wurde die entsprechende eingewogene Menge Resomer R 203 zu dem

vorgelegten Ethylacetat in ein lösungsmittelbeständiges Behältnis gegeben und sofort verschlossen. Der anschließende Mischvorgang wurde solange durchgeführt, bis das Resomerpulver vollständig in Lösung gegangen war.

3.1.3 Trägerimplantat

Als Trägerimplantat dienten sterile Titanfolien mit einem Durchmesser von 8 mm. Die Beschichtungen wurden mit der Kaltbeschichtungstechnologie durchgeführt. Dazu wurde das PDLLA-COPROGs-Homogenisat (100 µl pro Ø 8 mm Folie) auf sterile Titanfolien aufgetragen und für 24 Stunden unter der Laminar flow hood inkubiert, um Beschichtungslösung und Implantat steril zu halten. Nach Verdampfen des organischen Lösungsmittels und Trocknung bleibt ein mechanisch stabiler Polymerfilm mit dem Genvektorkonstrukt auf der Titanträgerfolie bestehen. Für die weitere Lagerung können diese bei 4°C steril verpackt aufbewahrt werden.

Bei der Beschichtung mit rhBMP-2 wurde analog vorgegangen. Das rekombinante BMP wurde vom DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg (Prof. Sebald) bezogen.

3.1.4 Haltung und Ernährung

Während der gesamten Versuchsphase wurden die Tiere im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München betreut. Bei dieser Studie kamen 6 Monate alte männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 500g zum Einsatz. Weibliche Versuchstiere wurden wegen des hormonellen Einflusses von Östrogen auf den Calcium-Stoffwechsel und damit die Knochenregeneration nicht verwendet. Jeweils 3 Tiere wurden zusammen in Makrolonkäfigen gehalten, die mit ausreichend Holzgranulatstreu, Zellstoff und anderen Nestbau-Materialien wie Pappröhrchen ausgestattet waren. Des Weiteren stand den Tieren während des gesamten Versuchszeitraums ausreichend frisches Wasser und Altromin® Trockenfutterpellets zur Verfügung. In den Räumlichkeiten des Tierstalls wurde eine konstante Temperatur von 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden aufrechterhalten.

3.1.5 Operationstechnik

Aufgrund des hohen Stoffwechselgrundumsatzes der Tiere wurde auf eine präoperative Nahrungskarenz verzichtet. Die Narkose wurde durch intramuskuläre Injektion von Medetomin (150µg/kg KG), Midazolam (2µg/kg KG) und Fentanyl (5µg/kg KG) eingeleitet. Es erfolgte die Positionierung des Tieres seitlich liegend auf dem OP-Tisch mit Sauerstoffversorgung (1l/min), mit Hilfe eines an der Hinterpfote angeschlossenen Pulsoxymeters wurde die Sauerstoffsättigung überwacht. Nach Rasur des Fells im Bereich des Unterkiefers wurde die Haut desinfiziert und das OP-Feld mit sterilen Tüchern abgedeckt. Es erfolgte die Darstellung des Kieferwinkels nach submandibulärer Inzision der Haut, Darstellung und Ablösung der Masseter-Pterygoid-Schlinge am Unterkieferrand und Ablösung des Periosts (Abb. 1a). Der critical size Defekt wurde nun ca. 2mm dorsal des Vorderrands des aufsteigenden Unterkieferastes sowie 2mm kranial des Basalbogens mittels Trepanbohrer gesetzt. Der Bohrer hatte einen Durchmesser von 5 mm und wurde unter Kühlung mit steriler Kochsalzlösung und langsamer Drehzahl verwendet (Abb.1b). Der Knochenspan wurde nach Lösung vorsichtig entnommen und etwaige Blutungen gestillt (Abb. 1c/d). Nach Spülung, Säuberung und Trocknung des Defektgebiets konnte die beschichtete Titanfolie mit einem Durchmesser von 8 mm mit der Wirkstoffseite nach medial eingebracht werden (Abb. 1e). Nach vorsichtiger Rückverlagerung der Muskelschlinge wurde diese mit resorbierbaren 4.0 Vicryl-Fäden vernäht. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls mit resorbierbaren Vicryl-Nähten (Stärke 3.0), um eine Nahtentfernung und die damit verbundene Stressbelastung der Ratten zu vermeiden. Zum zusätzlichen Schutz wurde ein Nobecutan Sprühverband appliziert (Abb.1f). Am Ende der Operation wurde den Ratten zur Antagonisierung der Narkose Atipamizol (0,75mg/kg KG) Flumazenil (200µg/kg KG) und Naloxon (120µg/kg KG) verabreicht. Die Operationszeit betrug zwischen 30 und 45 Minuten.

3.1.6 Postoperative Versorgung

Zur Anregung des Stoffwechsels wurde den Tieren vor oder während der Aufwachphase 5 ml Ringerlösung subkutan gespritzt und zur Analgesie 50mg/6h Metamizol und 0,2 mg/KG/24h Meloxicam verabreicht. Postoperativ wurden alle Tiere in wärmende OP-Tücher gewickelt. Die Käfige wurden zum Schutz von Wundinfektionen durch Schmutz mit ausreichend Zellstoff ausgelegt. Um der postoperativen Unterkühlung weiter entgegenzuwirken, waren für die ersten 24

Stunden Wärmelampen installiert. Alle Tiere wurden täglich zur Überwachung der Wundheilung und des Allgemeinzustandes kontrolliert.

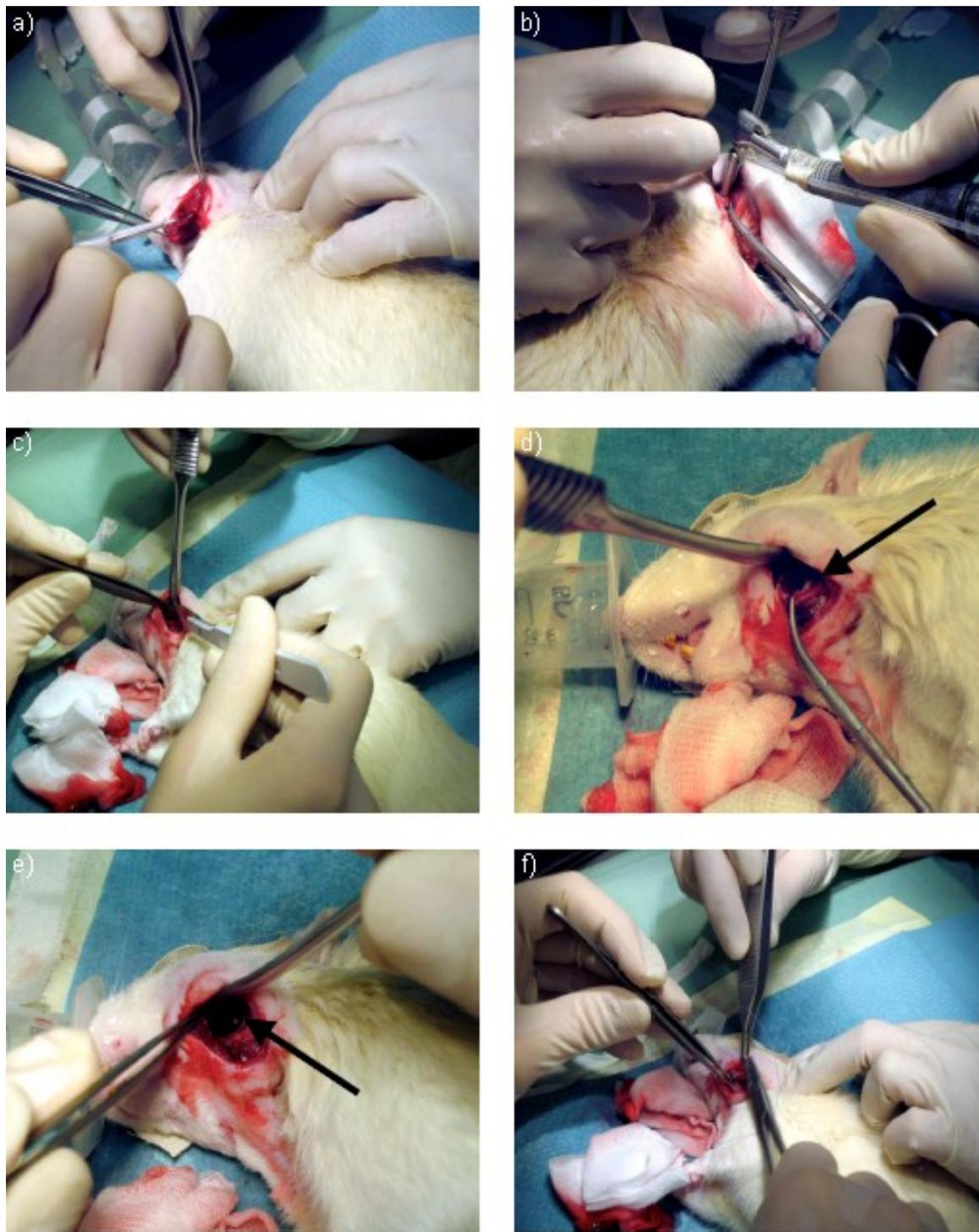


Abbildung 3: Operationsablauf (Kolk 2007)

Zur Schmerzprophylaxe fiel mit Meloxicam die Wahl auf ein nicht steroidales Antirheumatikum (Metacam) ohne negative Auswirkung auf die Knochenheilung. Um postoperativ eine schmerzfreie Nahrungsaufnahme zu ermöglichen und auch um

eine pathologische Unterkieferfraktur aufgrund zu hoher mechanischer Belastung zu vermeiden, wurde das Trockenfutter eingeweicht. Weiterhin stand den Tieren ausreichend Flüssigkeit zur Verfügung.

3.1.7 Euthanasie und Präparation

Nach Narkotisierung durch Inhalation von Isofluran wurden die Tiere mittels einer Überdosis Narcoren (Pentobarbital-Natrium 80mg/kgKG) euthanasiert.

Zur Darstellung des Unterkiefers wurden die auf dem Rücken liegenden Ratten durch eine mediane submandibuläre Inzision von den Schneidezähnen bis auf Höhe des Thymus eröffnet. Die Entnahme der Kiefer erfolgte unter Mitnahme des umgebenden Weichteilmantels im Kieferwinkelbereich (Mm. masseter et pterygoideus), um eine theoretisch mögliche ektope Knochenneubildung zu detektieren. Die Präparate wurden nach vorsichtiger Säuberung zur Fixierung für 24 Stunden in 3,4% gepufferte (0,1 m PBS, pH 7,4) Formalinlösung bei 25°C eingelegt. Nach Fixierung erfolgte die Entkalkung mit EDTA-Lösung (Osteosoft, Merck, Darmstadt) bei 25°C für mindestens 24 Stunden. Um die Antigenstrukturen bestmöglich zu erhalten, wurde hier bewusst die derzeit schonendste Methode mit EDTA gewählt. Der Grad der Entkalkung wurde nach Testschnitt mit dem Skalpell im anterioren Bereich des Kiefers überprüft. War der Knochen noch zu hart, wurde die Entkalkungszeit um jeweils 12 Stunden verlängert, bis der gewünschte Entkalkungsgrad erreicht war.

3.1.8 Herstellung der Schnitte

Nach Entkalkung der Präparate wurden diese zunächst quer, d.h. in kraniokaudaler Richtung am größten Diameter des Critical-size Defektes durchtrennt. Dies ermöglicht die Beurteilung des Übergangs von ortsständigem zu neu gebildetem Knochen in den zwei interessanten Dimensionen nach lateral/ medial und kranial/ kaudal. Im Zuge dessen konnten auch die Titanfolien vorsichtig entfernt werden, um das Schneiden der Präparate mit dem Mikrotom nicht zu erschweren. Die der Schnittfläche abgewandten Seiten des Präparats wurden mit Farbe markiert, um während des Einbettungsvorgangs eine problemlose Orientierung gewährleisten zu können. Nach der Entkalkung wurden die Präparate in einem Gewebeentwässerungsautomat (Shandon Excelsior, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) nach folgendem Schema entwässert.

1. 70% Ethanol: 1 Stunde
2. 80% Ethanol: 1 Stunde
3. 80% Ethanol: 1 Stunde
4. 96% Ethanol: 1 Stunde
5. 96% Ethanol: 1 Stunde
6. 100% Ethanol: 1 Stunde
7. 100% Ethanol: 1 Stunde
8. 100% Ethanol: 1 Stunde
9. Xylol: 2 Stunden
10. Paraffin 60°C: 4 Stunden

Im Anschluss wurden die Präparate eingebettet. Hierfür wurde 60° Celsius warmes Paraffin (Paraplast plus®, Kendall, tyco Healthcare, Mansfield, USA) mit Hilfe eines Paraffinspenders (Leica® EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH) in eine Schablone gegossen, die Proben mit der Farbmarkierung nach oben aufgelegt und erneut mit warmem Paraffin übergossen. Das Auskühlen der Paraffinblock erfolgte auf einer Kälteplatte (Leica® EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH). Anschließend wurden die Paraffinblöcke mit einem manuellen Rotationsmikrotom (Leica® RM 2125, Leica Microsystems, Nussloch GmbH) geschnitten, wobei sie während der gesamten Prozedur immer wieder auf Eis gekühlt wurden. Jeder Block wurde in das Gerät eingespannt und soweit angeschnitten, bis sich der gesamte Knochen in einer Schnittebene darstellte. Dann wurden 4 µm starke Schnitte angefertigt, die in ein VE-Wasserbad (entmineralisiertes Wasser) gegeben wurden. Dann wurde das Präparat auf einen beschichteten und beschrifteten Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Nach dem Schneiden schloss sich eine dreitägige Lagerungsphase bei 37°C/54°C im Wärmeschrank an, bevor mit den Färbungen begonnen werden konnte.

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen wurde von allen Präparaten noch eine HE (Hämatoxylin Eosin)-Färbung zur Übersicht angefertigt.

Immunhistochemische Färbungen

Während in anderen Arbeiten wie angesprochen an nicht entkalkten Präparaten Untersuchungen zu Mineralisation, Histomorphometrie und Fluoreszenzmarkierung erfolgten, wurden die Proben hier entkalkt und in Paraffin eingebettet, da sich so einerseits sehr viel feinere Schnitte von ~ 4 µm anfertigen lassen und andererseits

die Erhaltung der Antigene während Einbettung und Weiterverarbeitung zuverlässiger gewährleistet werden kann.

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, die das Detektieren von Antigenen in Gewebeschnitten ermöglicht. Die Schnitte werden zu diesem Zweck Antikörpern ausgesetzt, die spezifische Epitope im Gewebe erkennen. Mit Hilfe eines Markers, der an einen Antikörper gebunden ist, kann das Epitop sichtbar gemacht werden. Zur Verfügung stehen fluoreszierende Marker-Enzyme, Radioaktivität oder kolloidales Gold. Es gibt zwei Methoden zur Detektion, die sogenannte direkte Methode, bei der ein markierter Antikörper das Antigen bindet und detektiert wird, sowie die indirekte Methode, bei welcher ein nicht markierter Antikörper das Antigen bindet und von einem zweiten, markierten Antikörper, gebunden wird, der zur Detektion dient [Anonymous 2011].

Für die Untersuchung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität sowie der Gefäßversorgung wurden folgende Antikörper ausgewählt: Osteocalcin, CD 68, 1A4 und TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase; ELF-97). Zusätzlich war die Markierung von Endothelzellen mit CD 31 geplant, jedoch ist dieser Antikörper mit Reaktivität an Rattengewebe für paraffin-eingebettete Immunhistochemie aktuell nicht verfügbar.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Klonalität	Reaktivität	Spezifität
Osteocalcin	Novus Biologicals, Littleton, USA	1:1000	Monoklonal IgG2a	Human, Kaninchen, Ratte	Epitop einschl. γ -Carboxylrest an Position 17
CD 68	Antikörper Online, Aachen, Deutschland	1:100	Monoklonal IgG1	Human, Kaninchen, Ratte, Maus	Lysosomale Membran von myeloiden Zellen
TRAP	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA	1:100	Monoklonal IgG2b	Human, Ratte	N-terminale Region von TRAP
α -SMA	Antikörper Online, Aachen, Deutschland	1:2000	Monoklonal IgG2a	Human, Ratte, Maus	Smooth muscle alpha-actin

Tabelle 2: verwendete Antikörper

Zunächst wurden verschiedene Antikörperverdünnungen getestet, um die optimale Färbereaktion zu ermitteln. Nach Fixierung, Entkalkung und Einbettung der Proben wurden diese für die Immunhistochemie vorbereitet. Nach der Lagerungsphase im Wärmeschrank mussten die Schnitte zunächst mittels 20-minütiger Lagerung in Xylol

deparaffiniert werden. Anschließend fand die Rehydrierung in abnehmender Alkoholreihe statt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate für 10 Minuten Wasserstoffperoxid ausgesetzt gefolgt von der Spülung mit PBS – Puffer. Anschließend wurden die Präparate für 30 bis 45 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert und danach mit PBS–Puffer gespült. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 10 Minuten erfolgte die erneute Spülung mit PBS-Puffer, dann die Inkubation mit Label (Streptavidin-Enzym-Konjugat; alkalische Phosphatase) für 10 Minuten und Spülung mit Puffer. Anschließend wurden die Präparate mit dem Peroxidase Substrat AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präparate wurden nochmal 10 Minuten mit PBS – Puffer abgespült und eine Gegenfärbung mit Hämalaun (3 Minuten) und Bläuung (5 Minuten) durchgeführt. Die Schnitte konnten nun mit Aquatex® (Merck) eingedeckt und analysiert werden. Die konventionelle histologische Analyse wurde in einer vorangegangenen Arbeit bereits abgehandelt [Stöhrer 2009]. Deswegen soll hier darauf nicht näher eingegangen werden. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden o.g. Antikörper ausgewählt.

4 Ergebnisse

Die Schnitte wurden mithilfe des digitalen Mikroskops Biorevo BZ 9000 (Keyence, Osaka, Japan) ausgewertet.



Abbildung 4: Mikroskop mit angeschlossenem Rechner

Pro Objektträger lagen üblicherweise zwei Anschnitte der relevanten Region, also des Critical-size Defektes (CSD) mit Umgebung vor. Zur Analyse wurden die jeweils gegenüberliegenden Randreale sowie die Mitte des CSD herangezogen (Abb. 5)

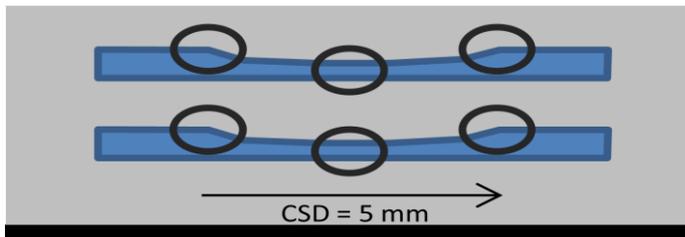


Abbildung 5: ROIs (region of interest) in schematischer Darstellung

Die Ausschnitte wurden in 10-, 40-, 100- und 200-facher Vergrößerung betrachtet und ab fotografiert. Nach Umzeichnen und Berechnen der Fläche wurden die Treffer pro definierter Fläche ausgezählt.

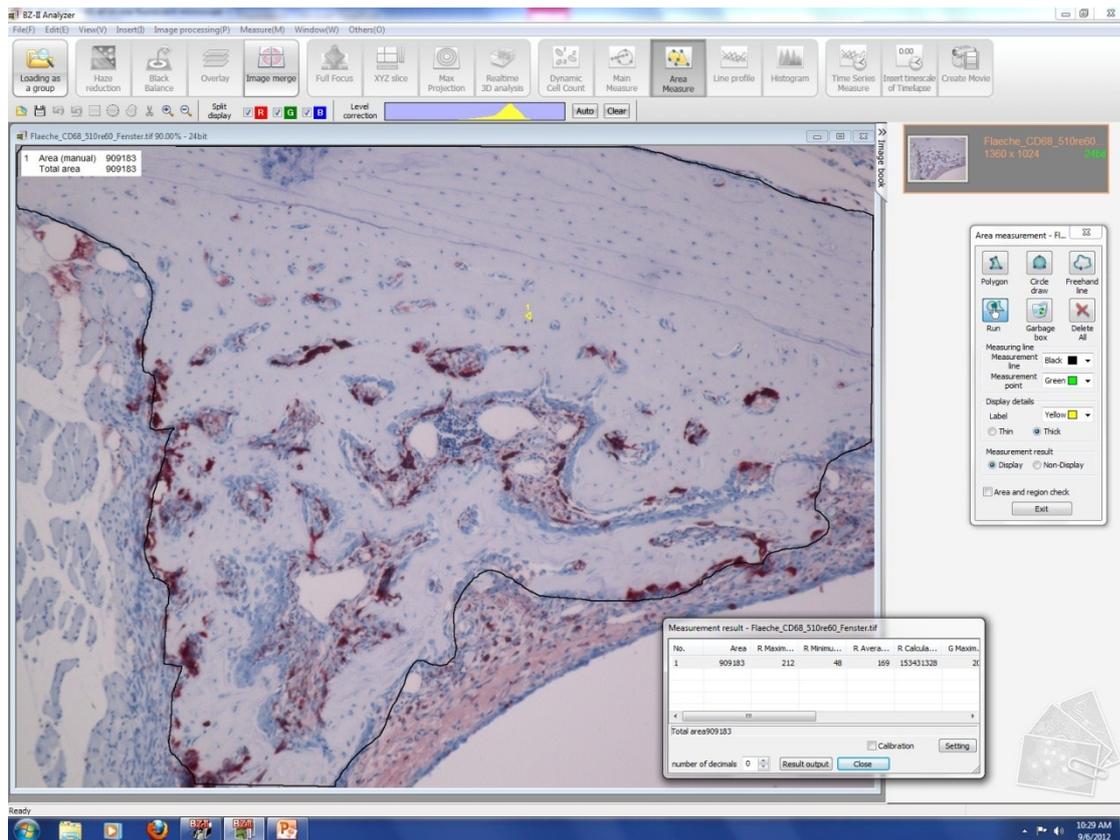


Abbildung 6: Screenshot der angezeichneten Fläche im Schnitt

Die Werte der äußeren ROIs konnten, unabhängig von der kranialen oder kaudalen Lage im Kiefer, zusammengefasst werden, da hier keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Ebenso verhielt es sich bei den zentralen ROIs. Zur Beurteilung der korrekten Anfärbung der Zielantigene wurden die Schnitte zusätzlich von einem erfahrenen Histologen untersucht. Hier zeigte sich bei der α -SMA-Färbung eine hohe unspezifische Anfärbung auch nicht gefäßähnlicher Strukturen, so dass beschlossen wurde, die Gefäße aus einem HE-Schnitt auszuzählen. Die TRAP-Färbung brachte keinen zusätzlichen Informationsgewinn zur CD 68-Färbung, also wurde auch diese Färbung aus der Statistik herausgenommen.

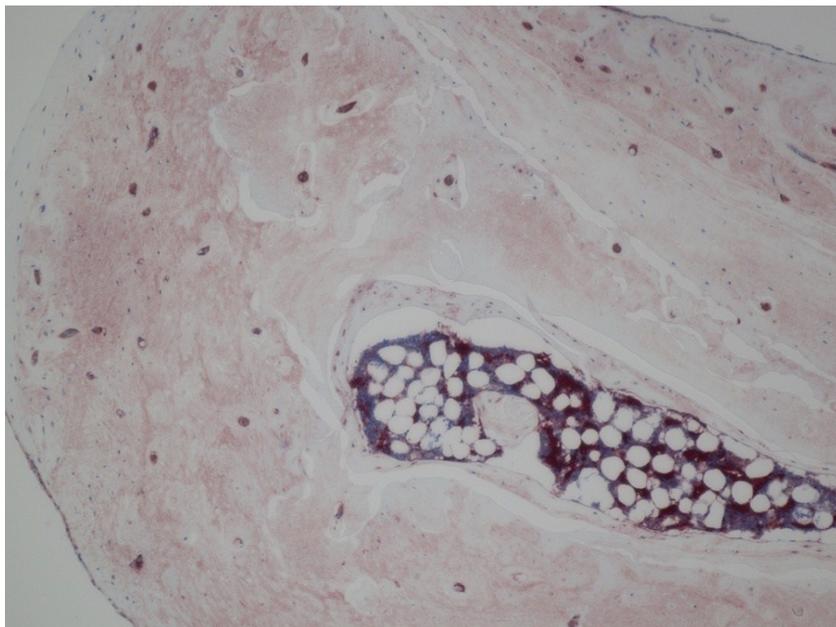


Abbildung 7: Osteocalcin-Färbung (Vergrößerung 200-fach; 324L)

Osteocalcin:

Die Zahl der Osteoblasten nahm sowohl bei den Plasmidtieren als auch bei den Proteintieren im Randbereich des Defekts im zeitlichen Verlauf signifikant zu (siehe Abb. 8 sowie Tab. 3, $p < 0,05$). Dieser Anstieg ließ sich auch zwischen den unterschiedlichen Beschichtungen (und Tötungszeitpunkten) nachweisen. Im zentralen Bereich nahm die Osteoblastenzahl im Verlauf zu, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. In diesem Bereich war nur bei den Proteintieren mit unterschiedlicher Lebensdauer ein signifikanter Unterschied zu erkennen (siehe Tab. 4). Zwischen den verschiedenen Beschichtungen ließ sich bei den jeweils gleichen Tötungszeitpunkten kein signifikanter Unterschied der Osteoblastenanzahl nachweisen. Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwertes waren bei den Osteocalcinauswertungen am niedrigsten (siehe Tab. 5+6).

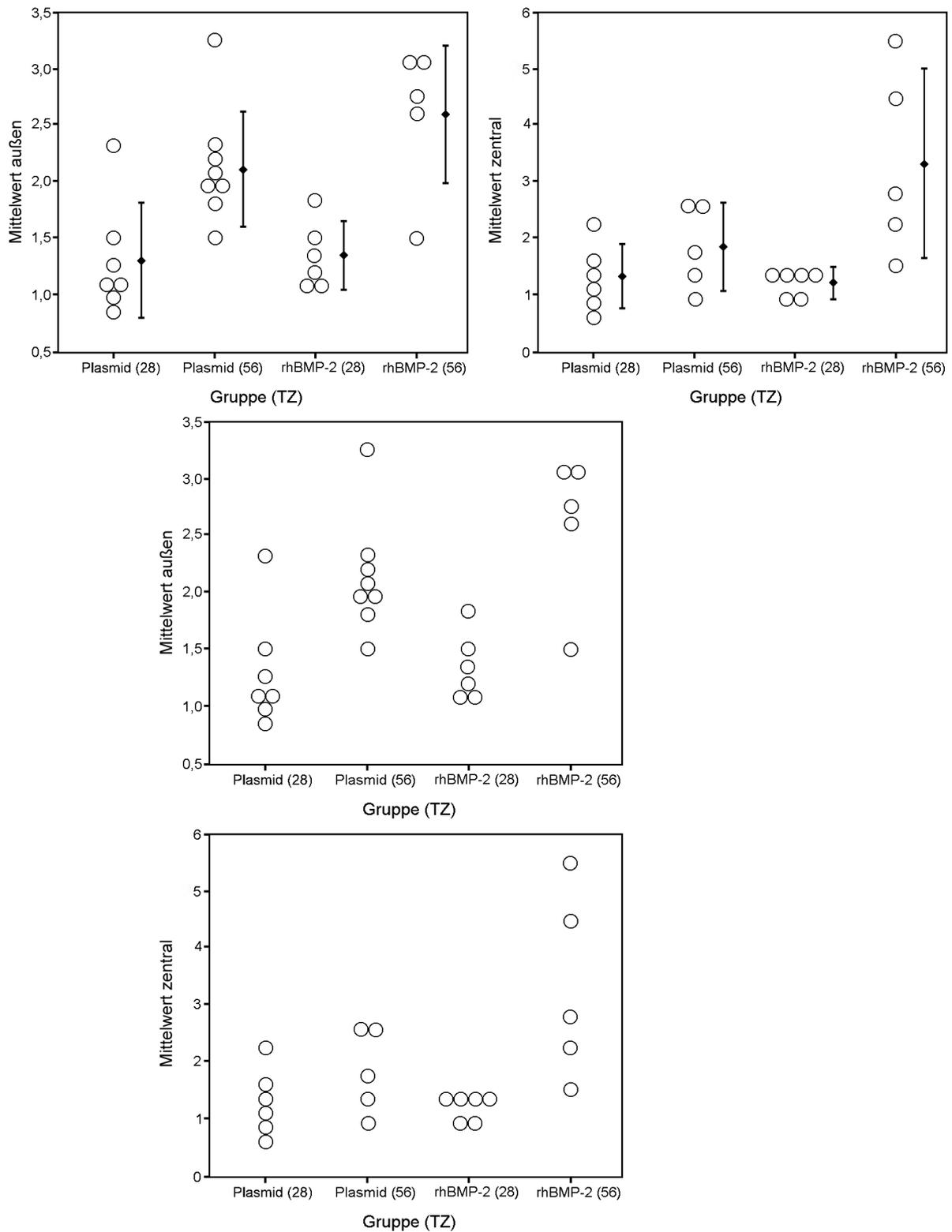


Abbildung 8: Mittelwerte der Osteocalcinexpression im Randbereich des critical size Defekts (linke Abb.) und zentral (rechte Abb.)

Gruppenvergleich Osteocalcin Randbereich						
Gruppe	Gruppe Vergleich	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,007	-0,80941	0,25490	-1,36072	-0,25811
	rhBMP-2_28	0,886	-0,03207	0,21851	-0,51873	0,45460
	rhBMP-2_56	0,006	-1,25919	0,33348	-2,04160	-0,47677
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,004	0,77735	0,21412	0,30848	1,24622
	rhBMP-2_56	0,215	-0,44977	0,33062	-1,22670	0,32715
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,008	-1,22712	0,30345	-1,98783	-0,46641

Tabelle 3: Gruppenvergleich Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenvergleich Osteocalcin Zentralbereich						
Gruppe	Gruppe Vergleich	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,228	-0,53462	0,40656	-1,48629	0,41704
	rhBMP-2_28	0,696	0,10019	0,24478	-0,49313	0,69352
	rhBMP-2_56	0,052	-1,98109	0,77052	-3,98831	0,02614
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,132	0,63482	0,34470	-0,28301	1,55265
	rhBMP-2_56	0,127	-1,44646	0,80784	-3,45878	0,56586
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,047	-2,08128	0,73975	-4,11562	-0,04694

Tabelle 4: Gruppenvergleich Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenstatistiken Osteocalcin Randbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	7	1,308	0,48378	0,18285
Plasmid_56	8	2,117	0,50230	0,17759
rhBMP-2_28	6	1,340	0,29303	0,11963
rhBMP-2_56	5	2,567	0,62359	0,27888

Tabelle 5: Gruppenstatistiken Osteocalcin Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes

Gruppenstatistiken Osteocalcin Zentralbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	6	1,298	0,56495	0,23064
Plasmid_56	5	1,832	0,74865	0,33480
rhBMP-2_28	6	1,198	0,20081	0,08198
rhBMP-2_56	5	3,279	1,64394	0,73519

Tabelle 6: Gruppenstatistiken Osteocalcin Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts

CD 68:

Bei der Zahl der CD68-positiven Osteoklasten waren zwischen den Gruppen und den Tötungszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Zwar zeigte sich tendentiell eine Zunahme der Zellzahl in der Plasmidgruppe in allen Messbereichen sowie eine Abnahme der Zellzahl in der Proteingruppe in allen Messbereichen, jedoch nicht unterhalb des Signifikanzniveaus (Abb. 10, Tab. 7+8). Am deutlichsten war die Zunahme bei der Proteingruppe im Randbereich, allerdings bei hoher Standardabweichung und einem großen Standardfehler des Mittelwerts in der rhBMP-2_56 Gruppe (Tab. 9). Insgesamt waren Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwerts in der CD68 Gruppe deutlich höher als in der Osteocalcingruppe (Tab.9+10).

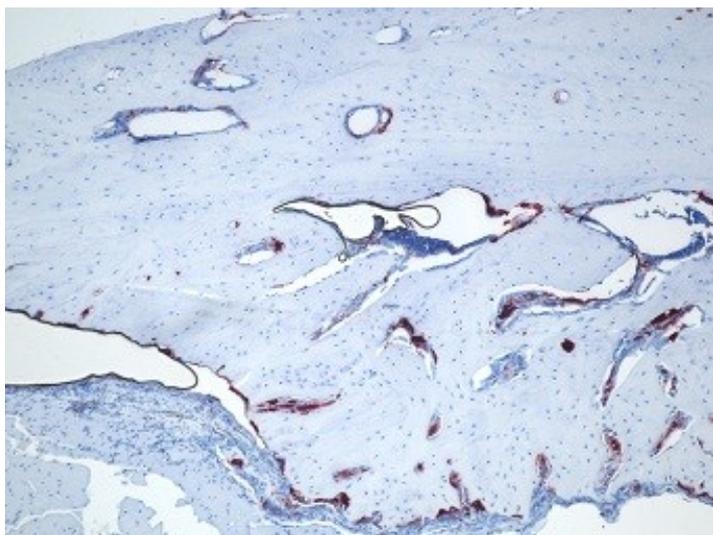


Abbildung 9: CD68-Färbung (Vergrößerung 40-fach; S5 li)

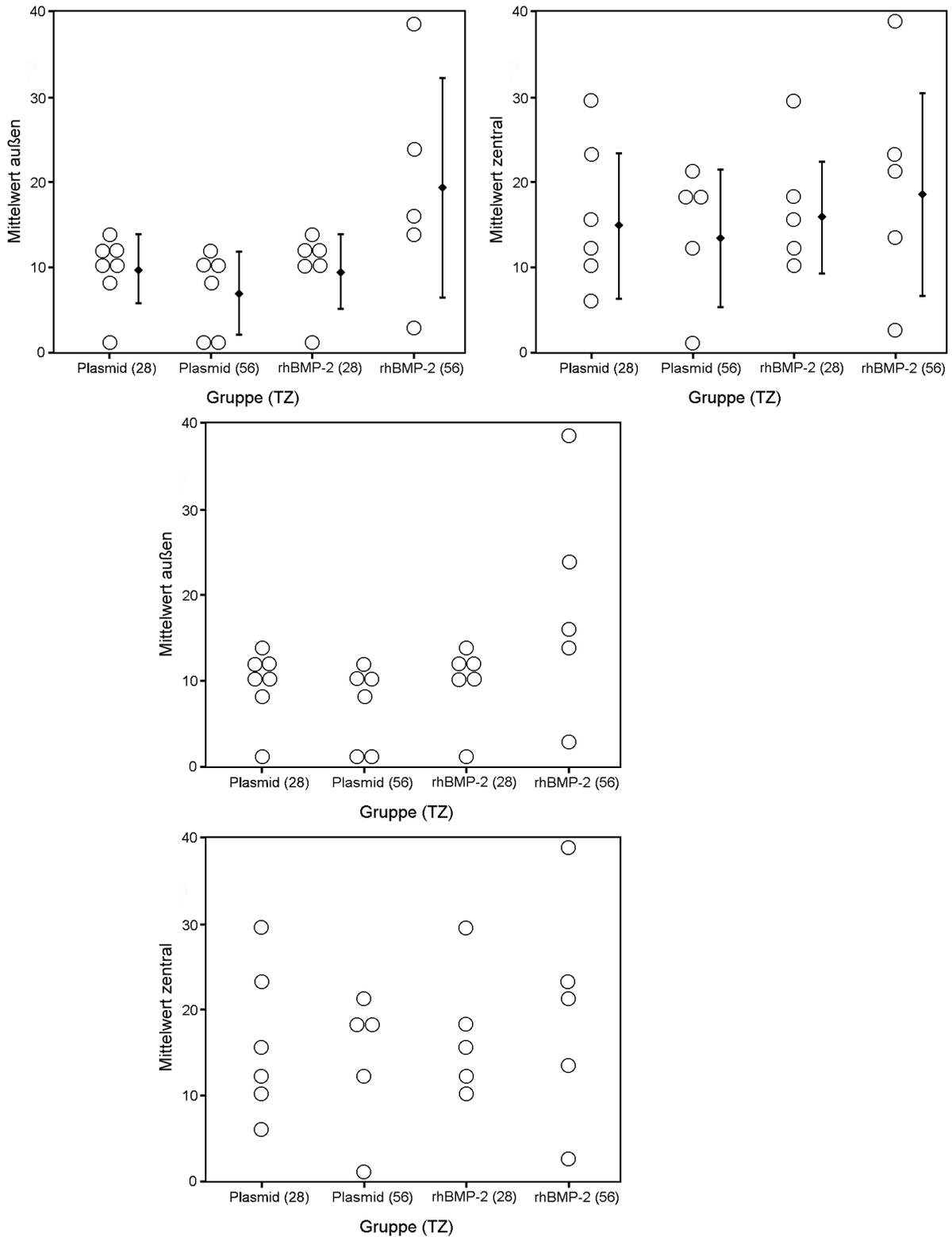


Abbildung 10: Mittelwerte der CD68-Expression im Randbereich des critical size Defekts (linke Abb.) und zentral (rechte Abb.)

Gruppenvergleich CD 68 Randbereich						
Gruppe	Gruppe (Vergleich)	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,290	2,81347	2,51685	-2,80640	8,43334
	rhBMP-2_28	0,984	0,05007	2,39527	-5,26709	5,36722
	rhBMP-2_56	0,206	-8,93965	6,06927	-25,00990	7,13061
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,331	-2,76340	2,70590	-8,79796	3,27116
	rhBMP-2_56	0,117	-11,75311	6,19844	-27,76491	4,25868
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,206	-8,98972	6,15007	-25,01801	7,03858

Tabelle 7: Gruppenvergleich CD68 Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenvergleich CD 68 Zentralbereich						
Gruppe	Gruppe (Vergleich)	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,722	1,73311	4,71379	-8,98367	12,44989
	rhBMP-2_28	0,850	-0,86745	4,44507	-10,92923	9,19433
	rhBMP-2_56	0,612	-3,35604	6,30242	-18,41758	11,70550
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,589	-2,60056	4,61363	-13,26441	8,06329
	rhBMP-2_56	0,455	-5,08915	6,42241	-20,37643	10,19813
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,703	-2,48859	6,22786	-17,53997	12,56278

Tabelle 8: Gruppenvergleich CD68 Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenstatistiken CD68 Randbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	7	9,814	4,07736	1,54110
Plasmid_56	6	7,001	4,87416	1,98987
rhBMP-2_28	6	9,764	4,49154	1,83366
rhBMP-2_56	5	18,754	13,12651	5,87036

Tabelle 9: Gruppenstatistiken CD68 Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes

Gruppenstatistiken CD68 Zentralbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	6	14,948	7,87900	3,21659
Plasmid_56	5	13,215	7,70497	3,44577
rhBMP-2_28	5	15,816	6,86011	3,06794
rhBMP-2_56	5	18,304	12,11901	5,41979

Tabelle 10: Gruppenstatistiken CD68 Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes

Gefäße:

Die Anzahl der Gefäße nahm im Randbereich sowohl bei den Plasmidtieren als auch bei den Proteintieren im zeitlichen Verlauf ab, ein signifikanter Unterschied zeigte sich aber nur in der Gruppe mit rekombinantem rhBMP-2 (Abb. 12, Tab. 11). Im zentralen Bereich waren die Unterschiede weniger deutlich. Hier waren weder zwischen den Plasmid- noch zwischen den Proteintieren signifikante Unterschiede zu erkennen (siehe Tab. 12). Der Standardfehler des Mittelwerts war in der rhBMP-2_56 Gruppe am größten. Wie auch bei der CD 68-Auwertung waren Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts in der Gefäßgruppe deutlich höher als in der Osteocalcingruppe (Tab. 13+14).

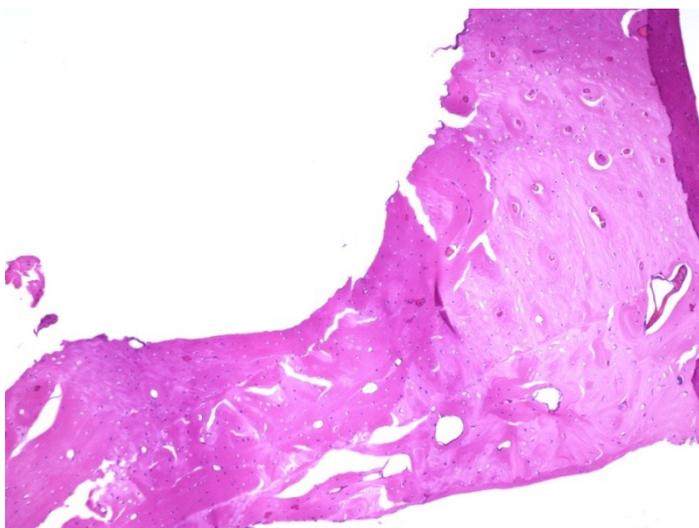


Abbildung 11: HE-Färbung (Vergrößerung 10-fach; 291L)

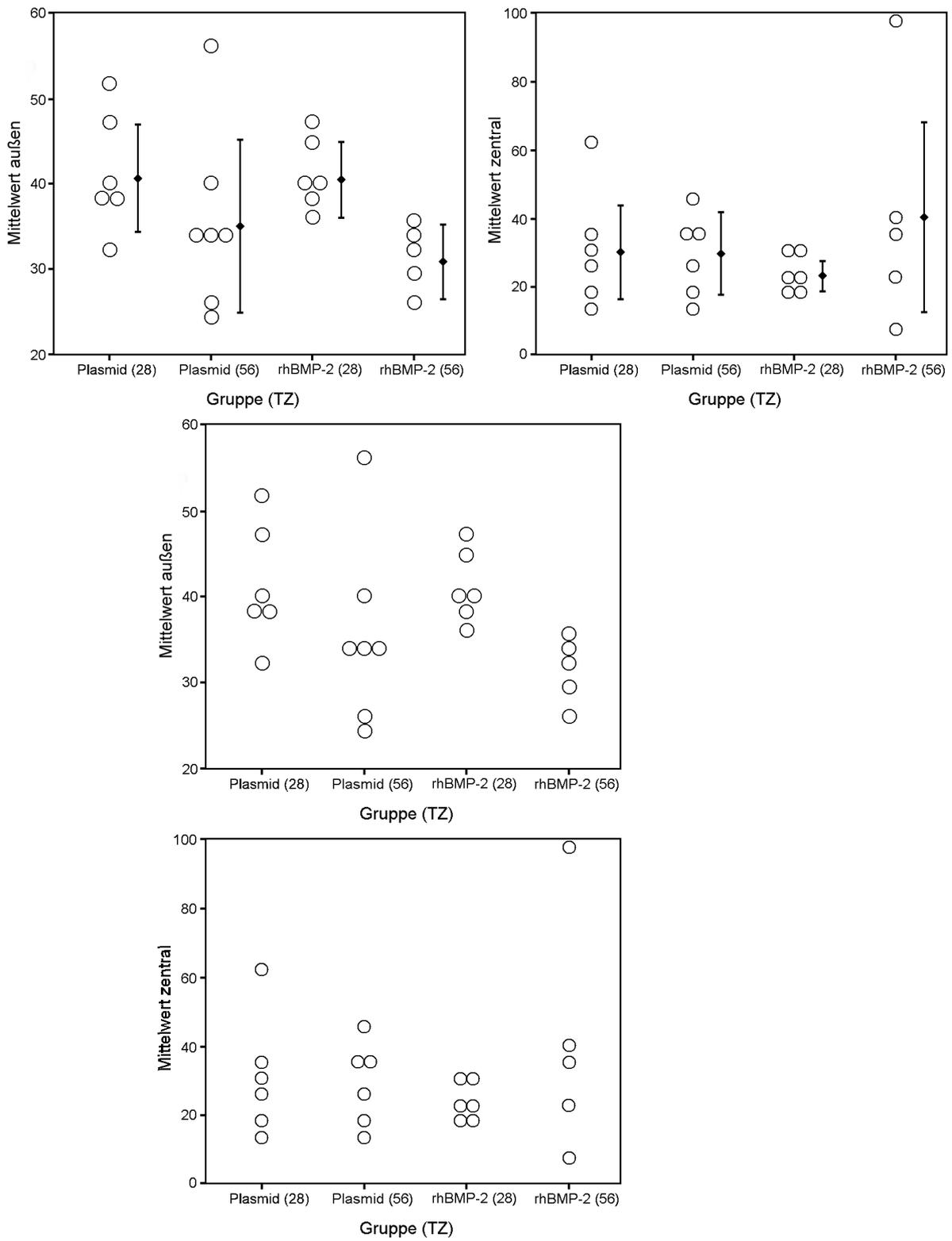


Abbildung 12: Mittelwerte der Gefäßanzahl im Randbereich des critical size Defekts (links) und zentral (rechts)

Gruppenvergleich Gefäße Randbereich						
Gruppe	Gruppe (Vergleich)	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,285	5,60180	4,97000	-5,39936	16,60297
	rhBMP-2_28	0,979	0,09195	3,42673	-7,76901	7,95291
	rhBMP-2_56	0,022	9,77860	3,48192	1,78824	17,76897
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,244	-5,50985	4,39182	-15,59308	4,57338
	rhBMP-2_56	0,373	4,17680	4,43502	-5,98120	14,33481
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,005	9,68665	2,59056	3,80078	15,57252

Tabelle 11: Gruppenvergleich Gefäße Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenvergleich Gefäße Zentralbereich						
Gruppe	Gruppe (Vergleich)	Signifikanz (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% KI der Differenz Untere	95% KI der Differenz Obere
Plasmid_28	Plasmid_56	0,844	1,74748	8,60975	-17,67443	21,16939
	rhBMP-2_28	0,355	7,31172	7,30663	-10,52450	25,14794
	rhBMP-2_56	0,605	-9,26257	16,92589	-51,40775	32,88261
Plasmid_56	rhBMP-2_28	0,352	5,56424	5,57457	-7,64918	18,77766
	rhBMP-2_56	0,529	-11,01005	16,25345	-53,12557	31,10548
rhBMP-2_28	rhBMP-2_56	0,346	-16,57429	15,60236	-59,19113	26,04256

Tabelle 12: Gruppenvergleich Gefäße Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz

Gruppenstatistiken Gefäße Randbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	6	40,844	7,17396	2,92876
Plasmid_56	7	35,242	10,62368	4,01538
rhBMP-2_28	6	40,752	4,35766	1,77901
rhBMP-2_56	5	31,065	4,21079	1,88312

Tabelle 13: Gruppenstatistiken Gefäße Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts

Gruppenstatistiken Gefäße Zentralbereich				
Gruppe	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Plasmid_28	6	31,042	17,00930	6,94402
Plasmid_56	6	29,294	12,46797	5,09003
rhBMP-2_28	6	23,730	5,56819	2,27320
rhBMP-2_56	5	40,304	34,51567	15,43588

Tabelle 14: Gruppenstatistiken Gefäße Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes

5 Diskussion

Tiermodell:

Die für diesen Versuch ausgewählten Tiere, 6 Monate alte männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 500g sind ein bewährtes Modell zu vielen Fragestellungen der rekonstruktiven Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich. Weibliche Versuchstiere wurden aufgrund des hormonellen Einflusses von Östrogen auf den Calciumstoffwechsels und damit die Knochenregeneration nicht verwendet. Der Critical-size Defekt (CSD) im Kieferwinkel wurde in seiner ersten Form von Kaban und Glowacki [Kaban 1981, Kaban 1979] sowie von diversen Arbeitsgruppen als zuverlässiges Modell für die Knochenheilung beschrieben [Deppe 2003, Hedner 1995, Higuchi 1999, Linde 1995, Lorente 1992]. Die Regeneration ist hauptsächlich von der Größe des Defekts abhängig; ohne unterstützende Maßnahmen würde bei einem CSD maximal eine bindegewebige Überbrückung stattfinden [Frame 1980, Hjorting-Hansen 1971, Simmons 1980, Takagi 1982]. Ein wichtiger Punkt ist, dass nur ausgewachsene Tiere verwendet werden, da bei nicht ausgereiften Tieren eine beschleunigte Heilung eintreten kann. Diese kann dazu führen, dass eine Spontanheilung bei einem Defekt auftritt, bei dem diese sonst nicht möglich wäre [Prolo 1982]. Auch kann innerhalb einer Spezies große Variabilität bezüglich der Geweberegeneration existieren [Enneking 1975, Prolo 1982]. In Bezug auf die Übertragbarkeit auf den Menschen, gerade was den Knochenstoffwechsel angeht, werden von vielen Arbeitsgruppen allerdings Tiere wie Schwein, Hund oder Schaf als geeignete Versuchstierspezies für den osteologischen Fragenkomplex favorisiert [Aerssens 1998, Fuerst 2004, Henkel 2006, Hönig 1993, Horner 1997, Jensen 2006, Mai 2005, Marx 2006, Weitz 2009, Wurzler 2004]. Die Knochenregeneration der Ratte ist mit der sekundären Knochenheilung des Menschen vergleichbar, allerdings ist die gebildete relative Knorpelmenge während der Knochenheilung höher als bei größeren Wirbeltieren und die Stoffwechselaktivität größer [Wissing 1990]. Da es sich bei diesem Versuch aber um einen proof of principle handelt und die Ratte gegenüber o.g. Tieren entscheidende Vorteile wie weitaus geringere Kosten, unkompliziertere Haltungsbedingungen sowie eine einfachere Handhabung aufweist, wurden Ratten als Versuchstier gewählt.

Bei der Verwendung von rekombinantem BMP als Wachstumsfaktor in der Unfall- und Neurochirurgie kommt es nicht selten zu gravierenden Nebenwirkungen bzw.

unerwünschten Effekten wie Osteolyse, Entzündung, Serombildung etc. [Garrett 2010, Perri 2007, Smucker 2006], auch wenn die Zahl der Berichte hierüber insbesondere in Industrie-gesponserten Arbeiten extrem niedrig ist [Aro 2011, Aspenberg 2011, Carragee 2011a, Carragee 2011b, Chi 2011]. Gerade in der Neurochirurgie kann dies aufgrund der benachbarten Strukturen gravierende Folgen wie Rückenmarksschädigungen oder Funktionseinschränkungen nach sich ziehen. Aber auch im Kopf-Hals-Bereich kann eine überschießende Knochenneubildung oder ausgedehnte Infektion zu schwersten Komplikationen führen. Aus diesem Grund ist es von essentieller Bedeutung, für lokal angewandte Wachstumsfaktoren eine optimale Dosis-Wirkungsbeziehung zu finden. Auf der einen Seite muss der Wachstumsfaktor am Wirkort eine suffiziente Konzentration aufweisen, um einen adäquaten intrazellulären Signalweg in Gang zu setzen, andererseits kann eine zu hohe Konzentration zu einer Absättigung der Rezeptoren und Verminderung der Rezeptorexpression führen [Cao 2007].

Neben morphologischen Beobachtungen benötigt man hier ein genaueres Verständnis der biologischen Vorgänge am Implantat-Knochen-Interface um die Dynamik der Regeneration besser zu verstehen und deuten zu können: Die organische Phase mineralisierten Gewebes besteht hauptsächlich aus Kollagen und nichtkollagenösen Matrixproteinen [Slavkin 1992, Young 1992, Zhou 1994]. Abhängig von Lokalisation und Differenzierungsgrad der produzierenden Zellen werden diese fortlaufend exprimiert. Der Nachweis der zeitlichen und räumlichen Expression spiegelt aller Wahrscheinlichkeit nach die Rolle der Proteine im Mineralisationsprozess wider [Sommer 1996]. Ein Großteil der Zellen, die die Komponenten der extrazellulären Matrix von mineralisiertem Gewebe synthetisieren, sind mesenchymalen Ursprungs, wie auch die Osteoblasten [Sommer 1996].

Osteoblasten:

Da Osteocalcin als einziges spezifisches Protein reifer Osteoblasten beschrieben ist [Sommer 1996], wurde es als Marker für das Ausmaß der erfolgten Knochenbildung gewählt. Osteocalcin (auch Bone gla Protein; BGP) ist ein aus 49 Aminosäuren bestehendes, kleines nichtkollagenöses Protein mit einem Molekulargewicht von 5800 kDa und gehört zur extrazellulären nichtkollagenen Knochenmatrix [Bronckers 1987]. Es wird gleichermaßen von Osteoblasten wie Odontoblasten synthetisiert [Christenson 1997, Sommer 1996]. In Osteoblasten wird die Synthese von 1,25(OH)VitD3 (Calcitriol, die physiologisch aktive Form des Prohormons Vitamin D3)

induziert. Es ist das meistvorkommende nichtkollagenöse Protein im Knochen und wird hauptsächlich in die Knochenmatrix eingebaut wo es an Hydroxylapatit gebunden ist [Caillot-Augusseau 1998, Gundberg 2000]. Nur ein kleiner Anteil des Osteocalcins wird in den Kreislauf freigesetzt. Die Serumkonzentration ist ein sensibler Marker für Knochenbildung und korreliert mit histomorphometrischen Indikatoren der Knochenbildung [Lieberman 2002, Swaminathan 2001]. Osteocalcin weist den Mineralisationsprozess nach, der durch die Mineralisierung der Osteozyten in der Kollagenschicht implementiert wird. Es tritt im Ablauf der Knochenreifung nach Kollagen I auf und ist neben diesem das quantitativ bedeutendste Protein der organischen Matrix [Garnero 1997, Vergnaud 1997]. Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen kommt Osteocalcin auch eine wichtige Rolle im Zuckerstoffwechsel zu. Hier soll es über Adiponectin an der Regulation der Insulinsensitivität beteiligt sein [Lee 2007]. Weiterhin wird angenommen, dass Osteocalcin bei der Induktion der Angiogenese sowie der pathologischen Mineralisation von Gefäßen eine Rolle spielt [Neve 2012]. Im vorliegenden Versuch diente der immunhistochemische Nachweis von Osteocalcin als Hilfsmittel zur Bestimmung der Osteoblastenzahl. Im Versuch kam es im zeitlichen Verlauf bei den Tieren der Plasmidgruppe (Plasmid_28 und Plasmid_56 evtl. einheitlich abkürzen) wie bei den Proteintieren (rhBMP_28 und rhBMP_56) im Randbereich zu einem signifikanten Anstieg der Osteoblastenzahl. Bei gleichen Tötungszeitpunkten waren auch zwischen den unterschiedlichen bioaktiven Beschichtungen (Plasmid vs. Protein) keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (siehe Tab. 3). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Plasmidapplikation der direkten Proteinapplikation im Randbereich im Bezug auf die Neubildung des Knochens annähernd gleichwertig ist. Im Gegensatz zum Randbereich war bei den Plasmidtieren im zentralen Bereich die Zunahme der Osteoblastenzahl nicht signifikant. Hier war im zeitlichen Verlauf zwar eine Zunahme zu beobachten allerdings ohne signifikante Differenz (siehe Abb. 8 sowie Tab. 4). Allein bei den Proteintieren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Osteoblastenzahl zu den späteren Tötungszeitpunkten. Die Unterschiede der Expressionszunahme im Randbereich und im Zentrum des Defekts lassen sich am wahrscheinlichsten durch die Lagebeziehung zum ortsständigen Knochen erklären: Im Randbereich ist durch die direkte Nachbarschaft zu potentiellen Vorläuferzellen und eine ideale Gefäßversorgung auch im zeitlichen Verlauf von einer optimalen nutritiven Situation auszugehen. Diese kann im zentralen Anteil nicht mit ähnlich

hoher Sicherheit vorausgesetzt werden. Allerdings nimmt bei den Proteintieren die Zahl der Osteoblasten auch im zentralen Anteil signifikant zu. Möglicherweise ist dieser Unterschied durch ein verändertes Antigenverhalten der Beschichtungen und damit erhöhte Chemotaxis zu erklären; das Protein mit seinen potentiell stärkeren antigenen Eigenschaften könnte mehr Vorläuferzellen als die Plasmid-Beschichtung anlocken. Dies würde aber wiederum indirekt Studien widersprechen, die eine Verbesserung des osteogenen Potenzials bei gleichen Dosen, aber langsamerer Freisetzung beobachten [Jeon 2008]. Auch spielt die Chemotaxis wohl vor allem in der initialen Phase der Freisetzung eine Rolle. Hier kommt es bei zu hohen Dosen von Wachstumsfaktoren häufig zum sog. „initial burst release“, einer unerwünschten explosionsartigen Freisetzung von bioaktiven Faktoren, die zu schweren Nebenwirkungen führen kann [Helm 1997, Rihn 2008, Shields 2006, Takahashi 2005b, Vaidya 2007, Yang 2004]. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung der stattfindenden Umbauvorgänge von Interesse. Dafür muss neben der osteoanabolen auch die osteokatabole Aktivität betrachtet werden.

Osteoklasten:

Zu diesem Zweck wurde das Osteoklastenvorkommen analysiert. Als Marker hat sich hierfür CD68 etabliert. CD68 ist ein transmembranes, glykosyliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa. Es gehört wie LAMP-1 und LAMP-2 zur Gruppe der glykosylierten lysosomalen Glykoproteine (LGP) [Holness 1993, Ramprasad 1995]. Diese sind Hauptbestandteile lysosomaler Membranen. Ihnen wird eine protektive Funktion gegenüber Hydrolasen zugesprochen [Fukuda 1991]. CD68 wird hauptsächlich in zytoplasmatischen Vesikeln sowie auf der Oberfläche von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert [Pulford 1990, Ramprasad 1996, Strobl 1995]. Aufgrund der hohen Sensitivität, aber nicht eindeutigen Spezifität von CD68 für Osteoklasten wurde zusätzlich die Zytomorphologie und die Lokalisation der CD68-positiven Zellen bei der Auszählung berücksichtigt. Um eine spezifischere Anfärbung der Osteoklasten zu erreichen, war die Anfärbung mithilfe eines weiteren spezifischeren Antikörpers gegen die Tartrat-resistente saure Phosphatase (s.u.) geplant. Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrate resistant acid phosphatase; TRAP) ist ein basisches, eisenbindendes Protein mit hoher Aktivität gegenüber Phosphoproteinen, ATP und 4-Nitrophenylphosphat. Außer in Osteoklasten wurde die Expression dieses Isoenzym in menschlichen Alveolarmakrophagen, Leber- und Milzzellen entdeckt. Die Funktion

dieses Enzyms im Rahmen des Knochenabbaus besteht darin, die bei Resorptionsprozessen endozytierten Knochenabbauprodukte wie Bestandteile der Hydroxylapatitkristalle und des Typ I-Kollagens durch Bildung reaktiven Sauerstoffs intrazellulär weiter abzubauen. Die dabei entstandenen Endabbauprodukte werden schließlich zusammen mit aktiven TRAP-Molekülen an der basolateralen Membran der Osteoklasten aus der Zelle sezerniert [Ventriciglia 2003]. Allerdings zeigte sich bei den TRAP-Färbungen nicht in allen Fällen eine ausreichende Anfärbung der Osteoklasten (siehe Abb. 13 links: fehlende Anfärbung von Osteoklasten), so dass diese aus der statistischen Kalkulation der Resultate herausgenommen werden mussten.

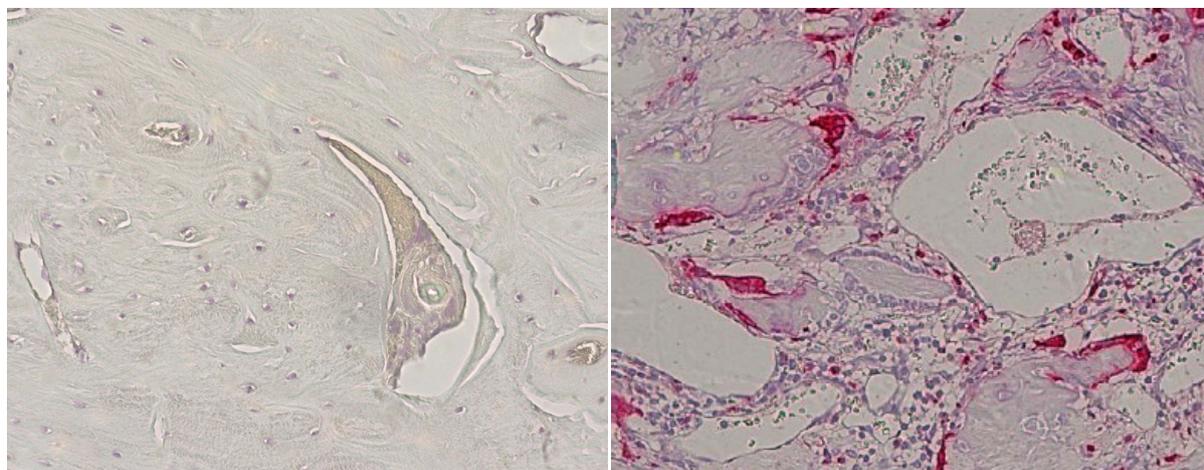


Abbildung 13: TRAP-Färbung (links G50L, 200x; rechts 9R40, 200x)

Bei Vergleichsschnitten (andere Gewebeschnitte aus ähnlichem Versuch, die hier nicht einbezogen werden, da sie einer anderen Fragestellung dienen) zur Überprüfung der spezifischen Anfärbung von Osteoklasten durch CD68 im Vergleich zu TRAP zeigte sich eine hohe Übereinstimmung. Hieraus lässt sich möglicherweise herleiten, dass die Behandlung der Präparate für eine Enzymfärbung wie TRAP nicht schonend genug erfolgt sein könnte. Möglicherweise spielt hier der Schritt der Entkalkung (zu schnell bzw. aggressiv) oder der Fixierungsdauer (zu lang oder in nicht geeignetem Medium) eine entscheidende Rolle.

Bei Betrachtung der Zunahme der Osteoklastenzahl zeigten sich weder zwischen den Tötungszeitpunkten noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede. Tendenziell nahm die Zellzahl in der Plasmidgruppe in allen Messbereichen ab und in der Proteingruppe in allen Messbereichen zu, jedoch nicht auf Signifikanzniveau.

Die deutlichste Zunahme war bei der Proteingruppe im Randbereich zu erkennen allerdings bei hoher Standardabweichung und einem großen Standardfehler des Mittelwerts in der Proteingruppe mit 56 Tagen Überlebenszeit. Insgesamt waren Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwerts in der CD68 Gruppe deutlich höher als in der Osteocalcingruppe. Dies könnte mit der oft sehr unregelmäßigen Verteilung und nestförmigen Anordnung von Osteoklasten in erklärt werden. Weiterhin spricht die gleichbleibende Expression gegen einen übermäßigen Turnover des Knochens, wie er bei zu hohen Dosen oft beobachtet wird. Gerade eine Überdosierung sollte aber unbedingt vermieden werden, da neben den hohen Kosten häufig unerwünschte Effekte wie Serombildung, schlechte Knochenqualität und ektopische Knochenneubildung die Folge sind [He 2010, Smith 2008, Wikesjo 2008, Wildemann 2011]. Während der direkte Einfluss von BMPs auf die Osteoklastenformierung in vitro kontrovers diskutiert wird [Maurer 2012, Okamoto 2006, Wutzl 2010], ist die zentrale Bedeutung der Zytokine der BMP-Familie für die Angiogenese unbestritten [Cackowski 2010, David 2009, Deckers 2002, Kokubo 2003, Kokubo 2008, Prosdocimo 2011].

Gefäßdichte:

Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Gefäßversorgung des neugebildeten Knochens untersucht. Für diese Fragestellung wird in der Literatur häufig alpha-SMA erwähnt: alpha-smooth muscle actin (SMA; 1A4) ist ein vornehmlich in glatten Muskelzellen der Darmwand, des Myometriums und der Gefäße vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Weiterhin kommt es in Perizyten vor, die der Außenwand von Kapillaren anliegen [Skalli 1989]. Sie lagern den Endothelzellen auf und umspannen mit ihren Fortsätzen das Gefäß; über tight junctions [Bruns 1968a, b, Epling 1966] bzw. Zonulae adhaerentes, in denen wahrscheinlich erhöhte Fibronektinkonzentrationen vorliegen [Courtoy 1983], sind sie miteinander verbunden. Perizyten stabilisieren die Kapillarstruktur und spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. SMA wird daher häufig zu Fragestellungen bezüglich Gefäßversorgung und -neubildung verwendet [Berthod 2011, Busuioc 2011, Couto 2011, Kakudo 2011, Silva 2011]. Neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge könnten Perizyten außerdem zu den Vorläuferzellen der heterotopen Ossifikation gehören [Stein 2001].

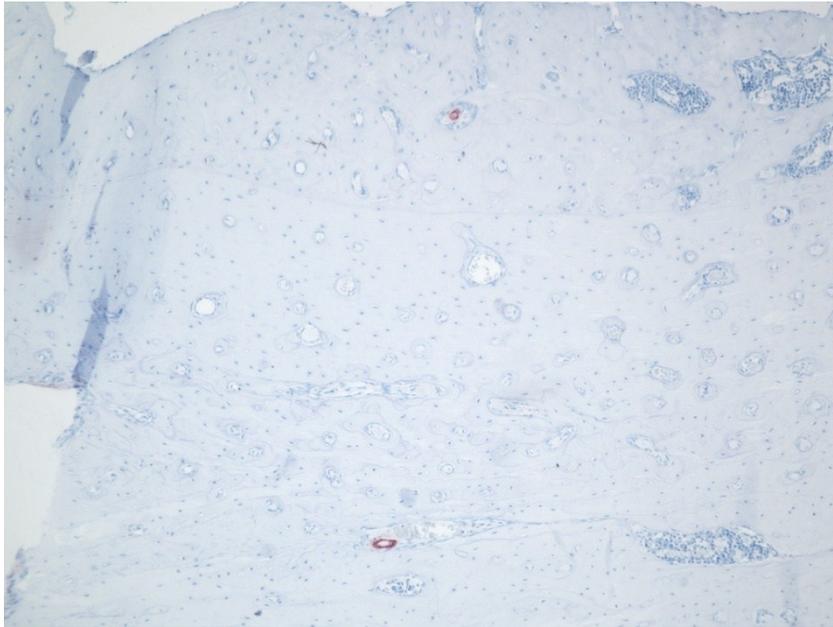


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit alpha-SMA (Vergrößerung 40-fach; W445li)

In den SMA-gefärbten Schnitten zeigte sich eine gute Markierung größerer Gefäße, allerdings wurden kleinste Arteriolen und Kapillaren nicht suffizient angefärbt (siehe Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit alpha-SMA (Vergrößerung 40-fach; W445li) sowie Abbildung 15 mit vergrößertem Ausschnitt. Stein weist in einer Arbeit auf den Expressionsverlust von SMA bei Ausbildung von Mineralisationszonen innerhalb von Perizytenkulturen hin. Dies ist ein Nachweis der phänotypischen Umorientierung der Perizyten in eine osteogene Richtung bzw. in die Richtung einer primitiven polymorphen Mesenchymzelle. Stein stellt hierzu die Hypothese des Perizyten als schlafende Stammzelle auf. Nach seinen Befunden gehören Perizyten zu Vorläuferzellen der heterotopen Ossifikation. [Stein 2001]. Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass sich neu bildende Kapillaren, die anfangs ausschließlich aus Endothelzellen bestehen, möglicherweise nicht erfasst werden [Harry 2003]. So ist es sehr wahrscheinlich, dass die Anzahl der in dieser Studie durch SMA dargestellten Gefäße kleiner sein muss, als eigentlich im untersuchten Gewebe enthalten ist.

Gerade letztere sind aber für die hier geforderte Fragestellung von größter Bedeutung, so dass nach einer Alternative gesucht werden musste. Zunächst war die Markierung von Endothelzellen mit CD 31 geplant, jedoch ist ein Antikörper mit Reaktivität gegen Ratte für Immunhistochemie am Paraffinschnitt aktuell nicht verfügbar.

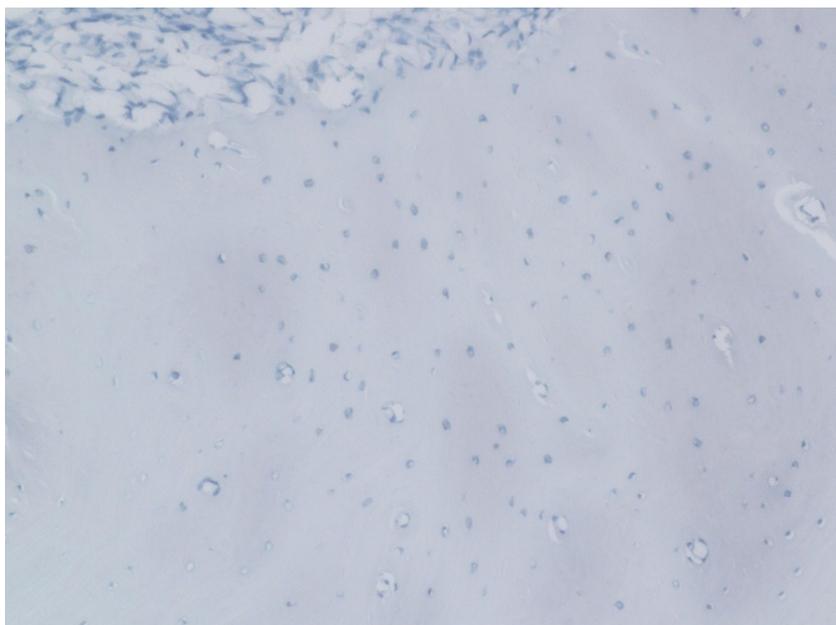


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung mit alpha-SMA (Ausschnitt aus Abb. 14, Vergrößerung 200-fach)

Deshalb wurden zur Orientierung HE-Schnitte herangezogen, auf denen sich auch kleinste Gefäße anhand der meist vorhandenen intraluminalen Erythrozyten gut identifizieren ließen.

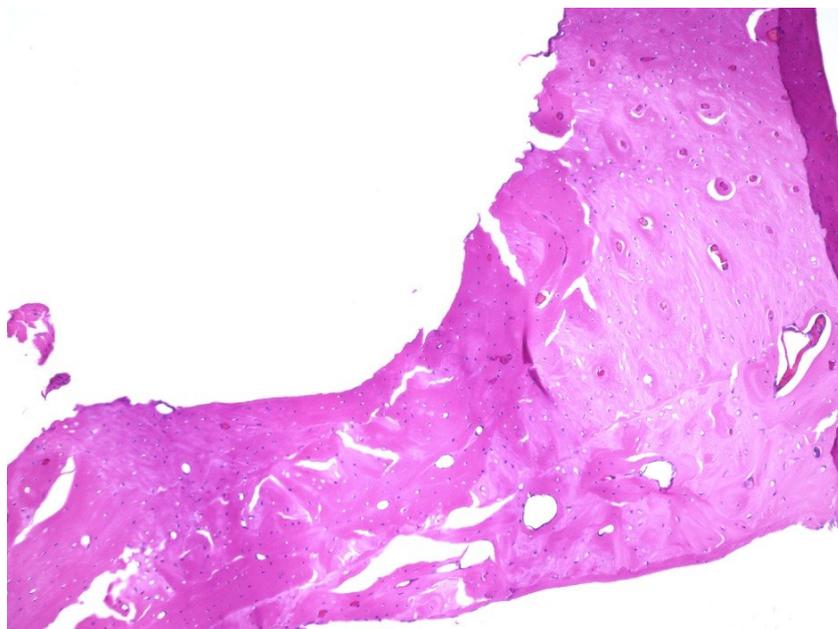


Abbildung 16: HE-Färbung (Vergrößerung 10-fach, 291)

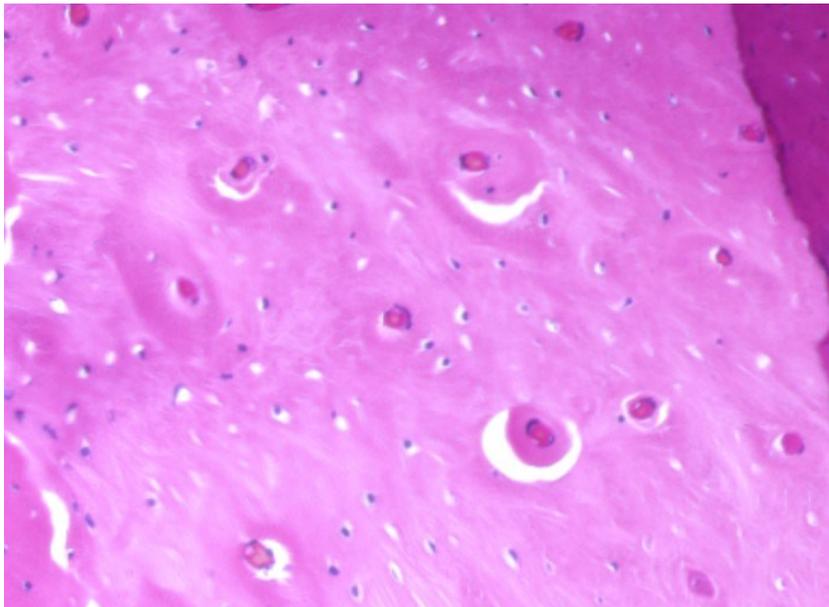


Abbildung 17: HE-Färbung (Ausschnitt aus Abb. 16, Vergrößerung 50-fach)

Die Anzahl der Gefäße nahm im Randbereich sowohl bei den Plasmid- als auch bei den Proteintieren im zeitlichen Verlauf ab, allerdings war nur die Abnahme in der Gruppe der Proteintiere signifikant (Tab. 11). Die Unterschiede im zentralen Defektbereich waren weniger deutlich, eine Signifikanz ließ sich hier weder bei den Plasmid- noch bei den Proteintieren feststellen (Tab. 12). In der Proteingruppe mit der höheren Konzentration war der Standardfehler des Mittelwerts am größten. Die Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts waren –ähnlich wie bei den CD68-Färbungen- bei der Auszählung der Gefäße deutlich höher als bei den Osteoblasten (Tab. 13+14).

In der Knochenregeneration nimmt die Gefäßversorgung eine zentrale Rolle ein, sie ist beispielsweise in der Frakturheilung neben der Ruhigstellung eine der essentiellen Bedingungen für eine komplikationslose knöcherne Durchbauung des Frakturspalts. Gerade die initiale Vaskularisierung des Kallusgewebes ist sehr empfindlich gegenüber mechanischen Rahmenbedingungen [Lienau 2005, Lienau 2006, Wallace 1994]. Weiterhin ist die Angiogenese eine Grundvoraussetzung für das Überleben von verheiltem bzw. engineerem Gewebe [Abshagen 2009], wie auch in einem critical size defect. So berichten Strobl et al. bei Anwendung von Angiogeneseinhibitoren über eine Nonunion der Frakturrenden bei der Ratte [Strobel 2011b]. Doch scheint die Gefäßversorgung bei der Knochenregeneration nicht die Hauptrolle zu spielen. Garcia et al. betonen vielmehr die Bedeutung osteogener

Faktoren, da es trotz suffizienter Vaskularisation zur inadäquaten Regeneration bzw. Pseudarthrose kommen kann [Garcia 2012]. Bei den osteogenen Faktoren spielt neben der Dosis des Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktors die Freisetzungskinetik die entscheidende Rolle. Bei zu hohen Dosen kann es neben Seromen bzw. Hämatomen, Infektionen und ektopter Ossifikation auch zu einer Kompression anatomisch wichtiger Strukturen und Implantatdislokationen kommen [Aro 2011, Bae 2012, Benglis 2008, Gautschi 2007, He 2010, Julka 2012, Kinsella 2011, Lee 2012, Perri 2007, Smith 2008, Smucker 2006]. Andererseits wird auch von einer Autoregulation von BMP bei zu hohen Dosen berichtet, allerdings bisher nur in vitro [Pereira 2000]. Außerdem scheint die Knochenqualität im Vergleich zu niedrigeren Dosen schlechter zu sein [Wikesjo 2008]. Der Grenzwert für überschießende Knochenneubildung bei der Anwendung von BMP scheint auch von der Spezies abhängig zu sein [Cook 1994, Linde 1995, Ripamonti 1996]. Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Suche nach der optimalen Dosis-Wirkungs-Beziehung, da neben der Vermeidung oben erwähnter Nebenwirkungen vor allem Kosten eingespart werden könnten.

Die in dieser Arbeit für die Proteintiere gewählte Dosis wurde aufgrund vorangegangener Studien und eigener in vitro-Ergebnisse gewählt. Die Zunahme der Osteoblastenzahl im untersuchten Knochen der Proteintiere weist auf eine stärkere Knochenneubildung im Vergleich zu den Plasmidtieren hin. Da es aber auch bei letzteren zu einer kompletten Durchbauung des Defekts kommt, stellt sich die Frage, ob die Dosis des BMP-2 bei den Proteintieren nicht weiter reduziert werden könnte, ohne ein Ausbleiben der Konsolidierung in Kauf zu nehmen. Vielleicht könnte hiervon auch die Qualität des Knochens profitieren; hier waren in Voruntersuchungen noch reichlich unmineralisiertes Osteoid und interzelluläre Substanz sowie mehr elastische Fasern vorhanden [Stöhrer 2009]. Ähnliches wird auch in Studien mit adsorbierten Wachstumsfaktoren beobachtet. Hier kommt es in einer zu frühen Phase zu erhöhten Konzentrationen, die die Knochenregeneration eher zu hemmen scheinen [Liu 2007a, Liu 2004b, Liu 2007b], da hier wohl auch resorptive Prozesse in Gang gesetzt werden [Benglis 2008, Paul 2009, Toth 2009]. Möglicherweise kann die Konzentration des Wirkstoffes reduziert werden. Dies könnte aber zu einem raschen Abfall der Wirkstoffkonzentration unter eine effektive Dosis und damit einer zu kurzen Wirkdauer führen.

Wirkstoffkonzentration:

Eine Möglichkeit, die Konzentration des BMPs ohne Einbußen bei der Stimulation der Knochenneubildung zu reduzieren bzw. die Anzahl osteogener Zellen am Zielort zu erhöhen, ist die Implantation differenzierter oder undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen, was im klinischen Alltag bereits erfolgreich umgesetzt wird [Hernigou 2005, Jager 2009, Wongchuensoontorn 2009]. Diskutiert wird auch die Notwendigkeit der Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren, da in den meisten Studien nur ein Faktor verwendet wird [Bessho 2002, Burdick 2002, Mehta 2012]. Das „Diamond concept“ [Giannoudis 2009] sieht neben den osteogenen Zellen noch das Zusammentreffen eines osteokonduktiven Gerüsts und einer osteoinduktiven Stimulation im gesunden umliegenden Gewebe als essentiell an [Calori 2011, Giannoudis 2007, Giannoudis 2008]. Fehlt einer dieser Faktoren vollständig oder teilweise oder tritt er zum falschen Zeitpunkt auf, kann die Physiologie der Knochenregeneration aus dem Gleichgewicht gebracht werden, mit der Folge von möglichen Komplikationen [Giannoudis 2008].

Trägersubstanz:

Da neben der Dosis des Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktors die Freisetzungskinetik eine entscheidende Rolle spielt, kann man durch Veränderungen am Trägermaterial die regenerative Wirkung entscheidend beeinflussen. Prinzipiell kommen als Trägersubstanz neben beschichteten Folien -wie hier verwendet- oder anderen Implantaten auch diverse Scaffolds in Betracht [Morishita 2006, Quarto 2001, Warnke 2004]. Einige Arbeitsgruppen erhoffen sich durch Verwendung neuer dreidimensionaler Trägermaterialien, im Idealfall mit biomimetischer Funktion, eine effektivere Nutzung bzw. höhere Effektivität von BMP und dadurch mögliche Dosisreduktion [Brown 2011, Haidar 2009, Kolambkar 2011, Lee 2011, Liu 2005, Majid 2011, Zhou 2009]. Lee konnte beispielsweise durch die Kombination eines Kollagenschwamms mit eingearbeiteten Nanofasern die benötigte BMP-Dosis bei gleicher Wirkung um 90% reduzieren [Lee 2013]. Im vorliegenden Versuch handelt es sich bei der PDLLA-Beschichtung der Titanfolie streng genommen nur um ein zweidimensionales Konstrukt, in welches die bioaktiven Wirkstoffe inkorporiert sind. Allerdings sind beschichtete Titanimplantate aus mechanischer Sicht nicht einfach durch Kollagenschwämme oder andere dreidimensionale Konstrukte zu ersetzen. Bezüglich der Freisetzungskinetik wird ein langsamer und kontrollierter also programmierter Release angestrebt. Hier soll bei gleicher Dosis die osteogene Potenz höher sein [Jeon 2008]. Zusätzlich ist der Zeitpunkt der BMP2-Applikation

entscheidend, eine verzögerte Freisetzung ist laut einigen Arbeiten effektiver [Betz 2007, Liu 2005, Schliephake 2010, Seeherman 2006]. Da die bioaktiven Wirkstoffe in der vorliegenden Versuchsanordnung in die PDLLA-Beschichtung inkorporiert sind und erst nach Resorption der äußersten Schicht von den Zielzellen verwendet werden können, kann man hier von einer verzögerten Freisetzung ausgehen. Das BMP-Plasmid ist durch die COPROGs zusätzlich geschützt und erlaubt so über einen längeren Zeitraum die Internalisation von Zellen am Zielort. Hier sehen viele Autoren einen Vorteil gegenüber der direkten Proteinapplikation, da Proteine nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben [DeCoster 2004, Eppley 2005, Fang 1996, Huang 2005, Parikh 2002, Peter 1998, Rose 2002]. Dies ist ein wichtiger Schritt zur Annäherung an die physiologischen Vorgänge bei der Knochenregeneration, auf die das Hauptinteresse der Forschung zur Knochenregeneration abzielt. Neben der Verwendung mehrerer Wachstumsfaktoren ist von entscheidender Bedeutung, die Freisetzungskinetik besser zu verstehen. Da bislang alle erfolgreich eingesetzten Arbeiten auf empirischer oder trial and error basierter Methodik beruhen, versprechen hier eventuell mathematische Modelle und 3D-Zellkulturen oder Bioreaktoren Fortschritte bei der Erforschung effizienterer Freisetzungs- und Trägereigenschaften [Baker 2011, Chen 2007, Lin 2006, Tzafiri 2005, van Midwoud 2011, Webster 2010].

6 Zusammenfassung

Der osteoinduktive Effekt von bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ist in zahlreichen Studien getestet und belegt worden. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Wirkung unterschiedlicher Wachstumsfaktorapplikationen auf zelluläre (Osteoblasten und Osteoklasten) und vaskuläre Parameter bei der Knochenregeneration zu untersuchen.

Hierfür wurden in einem Tierversuch *Critical size Defekte* im Kieferwinkel von Sprague-Dawley-Ratten gesetzt und mit einer Titanfolie abgedeckt. Diese war mit PDLLA (Poly(D,-L)-Laktid) beschichtet, welches entweder einen COPROG - geschützten Genvektor mit BMP-2-Plasmid in verschiedenen Konzentrationen oder ein rekombinantes humanes BMP-2 enthielt. In Voruntersuchungen hatte sich im Vergleich zur Plasmidgruppe in der Gruppe mit rekombinantem Protein eine überschießende Neubildung von minderwertigem Knochen gezeigt.

Um der Ursache hierfür auf den Grund zu gehen, wurde eine immunhistochemische und histologische Untersuchung der drei zentralen Säulen der Osteogenese wie Osteoblasten, Osteoklasten und Vaskularisation durchgeführt. Die Osteoblasten wurden mit Osteocalcin und die Osteoklasten mit CD 68 angefärbt, während für die Vaskularisierung mangels spezifischer immunhistochemischer Marker die konventionellen histologischen Schnitte herangezogen wurden. Alle Treffer wurden mit einer Bilderkennungssoftware direkt auf die gesamte zu untersuchende Knochenfläche bezogen und so ein entsprechender Quotient errechnet. Hinsichtlich Osteoklastenzahl und Gefäßversorgung unterscheidet sich die Methoden nichtviraler Gentransfer und rekombinantes Protein nicht wesentlich voneinander. Allerdings lässt der stärkere Anstieg der Osteoblastenzahl im zeitlichen Verlauf in der Proteingruppe eine zu hohe Dosierung des Proteins vermuten und könnte auch eine Erklärung für die in Vorversuchen nachgewiesene überschießende Knochenbildung sein. Die Ausgewogenheit der Osteoklastenanzahl im zeitlichen Verlauf wiederum lässt auf eine kontinuierliche Freisetzung der bioaktiven Wirkstoffe schließen, ohne dass es zu einem unerwünschten „initial burst release“ kommt. Der hier nachgewiesene Rückgang der Gefäßanzahl wird so auch in der Literatur beschrieben, normalerweise wird dies durch zunehmende Gefäßdurchmesser kompensiert. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte weiter an einer Optimierung der Dosis-Wirkungsbeziehung osteoinduktiver Faktoren gearbeitet werden, um diese

bereits in der Klinik angewandte Technologie kostengünstiger, aber vor allem sicherer, vorhersagbarer und komfortabler für den Patienten gestalten zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C.A., Economides, A.N., Stahl, N., Jilka, R.L., Manolagas, S.C. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 663-673
2. Abiraman, S., Varma, H.K., Umashankar, P.R., John, A. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials* 23 (2002) 3023-3031
3. Abshagen, K., Schrodi, I., Gerber, T., Vollmar, B. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone. *J Biomed Mater Res A* 91 (2009) 557-566
4. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G., Dequeker, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139 (1998) 663-670
5. Akita, S., Fukui, M., Nakagawa, H., Fujii, T., Akino, K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen* 12 (2004) 252-259
6. Akizuki, S., Yasukawa, Y., Takizawa, T. A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty. *Bull Hosp Jt Dis* 56 (1997) 222-224
7. Albrektsson, T., Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2 (2001) S96-101
8. Alden, T.D., Pittman, D.D., Hankins, G.R., Beres, E.J., Engh, J.A., Das, S., Hudson, S.B., Kerns, K.M., Kallmes, D.F., Helm, G.A. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 10 (1999) 2245-2253
9. Anonymous (2011) Ressourcen: Immunhistochemie (IHC). antibodies-online GmbH
10. Arnander, C., Westermark, A., Veltheim, R., Docherty-Skogh, A.C., Hilborn, J., Engstrand, T. Three-dimensional technology and bone morphogenetic protein in frontal bone reconstruction. *J Craniofac Surg* 17 (2006) 275-279
11. Aro, H.T., Govender, S., Patel, A.D., Hernigou, P., Perera de Gregorio, A., Popescu, G.I., Golden, J.D., Christensen, J., Valentin, A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *J Bone Joint Surg Am* 93 (2011) 801-808
12. Arosarena, O.A., Collins, W.L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132 (2005) 592-597
13. Aspenberg, P. Under-reported complications related to BMP use in spine surgery. *Acta Orthop* 82 (2011) 511-512
14. Bae, H.W., Strenge, K.B., Ashraf, N., Badura, J.M., Peckham, S.M., McKay, W.F. Transient Soft-Tissue Edema Associated with Implantation of Increasing Doses of rhBMP-2 on an Absorbable Collagen Sponge in an Ectopic Rat Model. *J Bone Joint Surg Am* 94 (2012) 1845-1852
15. Baker, M. Tissue models: a living system on a chip. *Nature* 471 (2011) 661-665
16. Baqain, Z.H., Anabtawi, M., Karaky, A.A., Malkawi, Z. Morbidity from anterior iliac crest bone harvesting for secondary alveolar bone grafting: an outcome assessment study. *J Oral Maxillofac Surg* 67 (2009) 570-575

17. Baylink, D.J., Finkelman, R.D., Mohan, S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2 (1993) S565-572
18. Becker, S.T., Warnke, P.H., Behrens, E., Wiltfang, J. Morbidity after iliac crest bone graft harvesting over an anterior versus posterior approach. *J Oral Maxillofac Surg* 69 (2011) 48-53
19. Benglis, D., Wang, M.Y., Levi, A.D. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 62 (2008) ONS423-431; discussion ONS431
20. Berthod, F., Symes, J., Tremblay, N., Medin, J.A., Auger, F.A. Spontaneous fibroblast-derived pericyte recruitment in a human tissue-engineered angiogenesis model in vitro. *J Cell Physiol* (2011)
21. Bessho, K., Carnes, D.L., Cavin, R., Ong, J.L. Experimental studies on bone induction using low-molecular-weight poly (DL-lactide-co-glycolide) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res* 61 (2002) 61-65
22. Betz, O.B., Betz, V.M., Nazarian, A., Egermann, M., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., Vrahas, M.S., Boussein, M.L., Evans, C.H. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects. *Gene Ther* 14 (2007) 1039-1044
23. Bissinger, O. (2011) Bildgebende Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation von rhBMP-2 versus Nukleinsäuretransfer am Rattenunterkiefer. Medizinische Dissertation. Technische Universität München München, p 107
24. Boden, S.D., Kang, J., Sandhu, H., Heller, J.G. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 27 (2002) 2662-2673
25. Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P., Goldstein, S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 5 (1999) 753-759
26. Boyne, P.J. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001) S146-150
27. Bronckers, A.L., Gay, S., Finkelman, R.D., Butler, W.T. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Miner* 2 (1987) 361-373
28. Brown, K.V., Li, B., Guda, T., Perrien, D.S., Guelcher, S.A., Wenke, J.C. Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. *Tissue Eng Part A* 17 (2011) 1735-1746
29. Bruns, R.R., Palade, G.E. Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J Cell Biol* 37 (1968a) 244-276
30. Bruns, R.R., Palade, G.E. Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J Cell Biol* 37 (1968b) 277-299
31. Buchholz, C.J., Stitz, J., Cichutek, K. Retroviral cell targeting vectors. *Curr Opin Mol Ther* 1 (1999) 613-621
32. Buck, B.E., Malinin, T.I., Brown, M.D. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res* (1989) 129-136
33. Burdick, J.A., Mason, M.N., Hinman, A.D., Thorne, K., Anseth, K.S. Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization. *J Control Release* 83 (2002) 53-63

34. Busuioc, C.J., Popescu, F.C., Mogosanu, G.D., Lascar, I., Pirici, I., Pop, O.T., Mogoanta, L. Angiogenesis assessment in experimental third degree skin burns: a histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 52 (2011) 887-895
35. Cackowski, F.C., Anderson, J.L., Patrene, K.D., Choksi, R.J., Shapiro, S.D., Windle, J.J., Blair, H.C., Roodman, G.D. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood* 115 (2010) 140-149
36. Caillot-Augusseau, A., Lafage-Proust, M.H., Soler, C., Pernod, J., Dubois, F., Alexandre, C. Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180-day space flight (Euromir 95). *Clin Chem* 44 (1998) 578-585
37. Calori, G.M., Giannoudis, P.V. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury* 42 (2011) 1191-1193
38. Cao, L., Mooney, D.J. Spatiotemporal control over growth factor signaling for therapeutic neovascularization. *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 1340-1350
39. Carragee, E.J., Ghanayem, A.J., Weiner, B.K., Rothman, D.J., Bono, C.M. A challenge to integrity in spine publications: years of living dangerously with the promotion of bone growth factors. *Spine J* 11 (2011a) 463-468
40. Carragee, E.J., Hurwitz, E.L., Weiner, B.K. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11 (2011b) 471-491
41. Chen, F.M., Zhang, M., Wu, Z.F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* 31 (2010) 6279-6308
42. Chen, R.R., Silva, E.A., Yuen, W.W., Brock, A.A., Fischbach, C., Lin, A.S., Guldberg, R.E., Mooney, D.J. Integrated approach to designing growth factor delivery systems. *FASEB J* 21 (2007) 3896-3903
43. Chi, J.H. Exposing conflicts of interest and complications of rhBMP-2. *Neurosurgery* 69 (2011) N21-22
44. Christenson, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30 (1997) 573-593
45. Cochran, D.L., Wozney, J.M. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 19 (1999) 40-58
46. Cook, S.D., Baffes, G.C., Wolfe, M.W., Sampath, T.K., Rueger, D.C. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* (1994) 302-312
47. Courtoy, P.J., Boyles, J. Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *J Ultrastruct Res* 83 (1983) 258-273
48. Couto, R.A., Kulungowski, A.M., Chawla, A.S., Fishman, S.J., Greene, A.K. Expression of angiogenic and vasculogenic factors in human lymphedematous tissue. *Lymphat Res Biol* 9 (2011) 143-149
49. Cricchio, G., Lundgren, S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res* 5 (2003) 161-169
50. David, L., Feige, J.J., Bailly, S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2009) 203-212
51. Davies, J.E. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 (1998) 391-401

52. De Long, W.G., Jr., Einhorn, T.A., Koval, K., McKee, M., Smith, W., Sanders, R., Watson, T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 89 (2007) 649-658
53. Deckers, M.M., van Bezooijen, R.L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143 (2002) 1545-1553
54. DeCoster, T.A., Gehlert, R.J., Mikola, E.A., Pirela-Cruz, M.A. Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 12 (2004) 28-38
55. Deppe, H., Stemberger, A., Hillemanns, M. Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18 (2003) 369-376
56. Dragoo, J.L., Lieberman, J.R., Lee, R.S., Deugarte, D.A., Lee, Y., Zuk, P.A., Hedrick, M.H., Benhaim, P. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* 115 (2005) 1665-1673
57. Dunn, C.A., Jin, Q., Taba, M., Jr., Franceschi, R.T., Bruce Rutherford, R., Giannobile, W.V. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. *Mol Ther* 11 (2005) 294-299
58. Egermann, M., Lill, C.A., Griesbeck, K., Evans, C.H., Robbins, P.D., Schneider, E., Baltzer, A.W. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Ther* 13 (2006) 1290-1299
59. Enneking, W.F., Burchardt, H., Puhl, J.J., Piotrowski, G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 57 (1975) 237-252
60. Epling, G. Electron microscopic observations of pericytes of small blood vessels in the lungs and hearts of normal cattle and swine. *The Anatomical Record* Volume 155, Issue, pages , (1966) 513-529
61. Eppley, B.L., Pietrzak, W.S., Blanton, M.W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 16 (2005) 981-989
62. Fang, J., Zhu, Y.Y., Smiley, E., Bonadio, J., Rouleau, J.P., Goldstein, S.A., McCauley, L.K., Davidson, B.L., Roessler, B.J. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 5753-5758
63. Finsinger, D., Remy, J.S., Erbacher, P., Koch, C., Plank, C. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther* 7 (2000) 1183-1192
64. Frame, J.W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 38 (1980) 176-180
65. Fuerst, G., Gruber, R., Tangl, S., Sanroman, F., Watzek, G. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 15 (2004) 301-307
66. Fukuda, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266 (1991) 21327-21330
67. Gamradt, S.C., Lieberman, J.R. Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res* (2003) 183-194
68. Gao, X., Huang, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 179 (1991) 280-285

69. Garcia, P., Pieruschka, A., Klein, M., Tami, A., Histing, T., Holstein, J.H., Scheuer, C., Pohlemann, T., Menger, M.D. Temporal and spatial vascularization patterns of unions and nonunions: role of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic proteins. *J Bone Joint Surg Am* 94 (2012) 49-58
70. Garnero, P., Delmas, P.D. Bone markers. *Baillieres Clin Rheumatol* 11 (1997) 517-537
71. Garrett, M.P., Kakarla, U.K., Porter, R.W., Sonntag, V.K. Formation of painful seroma and edema after the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral lumbar spine fusions. *Neurosurgery* 66 (2010) 1044-1049; discussion 1049
72. Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77 (2007) 626-631
73. Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3 (2005) S20-27
74. Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40 Suppl 3 (2009) S1-3
75. Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., Marsh, D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4 (2007) S3-6
76. Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., Schmidmaier, G., Marsh, D. The diamond concept--open questions. *Injury* 39 Suppl 2 (2008) S5-8
77. Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G., Hallek, M. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 5 (1999) 1052-1056
78. Gollwitzer, H., Thomas, P., Diehl, P., Steinhauser, E., Summer, B., Barnstorf, S., Gerdesmeyer, L., Mittelmeier, W., Stemberger, A. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. *J Orthop Res* 23 (2005) 802-809
79. Groeneveld, E.H., Burger, E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142 (2000) 9-21
80. Gundberg, C.M. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med* 20 (2000) 489-501
81. Haidar, Z.S., Hamdy, R.C., Tabrizian, M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 31 (2009) 1817-1824
82. Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J.R., Fu, F.H., Huard, J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 52 (2003) 753-768
83. Hanseler, P., Jung, U.W., Jung, R.E., Choi, K.H., Cho, K.S., Hammerle, C.H., Weber, F.E. Analysis of hydrolyzable polyethylene glycol hydrogels and deproteinized bone mineral as delivery systems for glycosylated and non-glycosylated bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater* 8 (2012) 116-123
84. Harry, L.E., Paleolog, E.M. From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69 (2003) 363-374
85. He, D., Genecov, D.G., Herbert, M., Barcelo, R., Elsalanty, M.E., Weprin, B.E., Opperman, L.A. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in large defects of the growing canine skull after dura mater replacement with a dura mater substitute. *J Neurosurg* 112 (2010) 319-328

86. Hedner, E., Linde, A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes--an experimental study in rat mandibular defects. *Eur J Oral Sci* 103 (1995) 236-241
87. Helm, G.A., Sheehan, J.M., Sheehan, J.P., Jane, J.A., Jr., diPierro, C.G., Simmons, N.E., Gillies, G.T., Kallmes, D.F., Sweeney, T.M. Utilization of type I collagen gel, demineralized bone matrix, and bone morphogenetic protein-2 to enhance autologous bone lumbar spinal fusion. *J Neurosurg* 86 (1997) 93-100
88. Henkel, K.O., Gerber, T., Lenz, S., Gundlach, K.K., Bienengraber, V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102 (2006) 606-613
89. Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., Rouard, H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87 (2005) 1430-1437
90. Higuchi, T., Kinoshita, A., Takahashi, K., Oda, S., Ishikawa, I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol* 70 (1999) 1026-1031
91. Hjorting-Hansen, E., Andreasen, J.O. Incomplete bone healing of experimental cavities in dog mandibles. *Br J Oral Surg* 9 (1971) 33-40
92. Holness, C.L., Simmons, D.L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81 (1993) 1607-1613
93. Hönig, J.F., Merten, H.A. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol IX* (1993) 244-254
94. Horner, K., Loeffler, K., Holtzmann, M. [Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development]. *Anat Histol Embryol* 26 (1997) 289-295
95. Huang, W., Rudkin, G.H., Carlsen, B., Ishida, K., Ghasri, P., Anvar, B., Yamaguchi, D.T., Miller, T.A. Overexpression of BMP-2 modulates morphology, growth, and gene expression in osteoblastic cells. *Exp Cell Res* 274 (2002) 226-234
96. Huang, Y.C., Simmons, C., Kaigler, D., Rice, K.G., Mooney, D.J. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Gene Ther* 12 (2005) 418-426
97. Ido, A., Numata, M., Kodama, M., Tsubouchi, H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 40 (2005) 925-931
98. Itoh, S., Kikuchi, M., Koyama, Y., Matumoto, H.N., Takakuda, K., Shinomiya, K., Tanaka, J. Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use. *Biomed Mater Eng* 15 (2005) 29-41
99. Jager, M., Jelinek, E.M., Wess, K.M., Scharfstadt, A., Jacobson, M., Kevy, S.V., Krauspe, R. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Curr Stem Cell Res Ther* 4 (2009) 34-43
100. Jensen, S.S., Brogгинi, N., Hjorting-Hansen, E., Schenk, R., Buser, D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 17 (2006) 237-243

101. Jeon, O., Song, S.J., Kang, S.W., Putnam, A.J., Kim, B.S. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 28 (2007) 2763-2771
102. Jeon, O., Song, S.J., Yang, H.S., Bhang, S.H., Kang, S.W., Sung, M.A., Lee, J.H., Kim, B.S. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 369 (2008) 774-780
103. Jones, A.L., Bucholz, R.W., Bosse, M.J., Mirza, S.K., Lyon, T.R., Webb, L.X., Pollak, A.N., Golden, J.D., Valentin-Opran, A. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 1431-1441
104. Julka, A., Shah, A.S., Miller, B.S. Inflammatory response to recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in the treatment of a proximal humeral fracture: a case report. *J Shoulder Elbow Surg* 21 (2012) e12-16
105. Kaban, L.B., Glowacki, J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J Dent Res* 60 (1981) 1356-1364
106. Kaban, L.B., Glowacki, J., Murray, J.E. Repair of experimental mandibular bony defects in rats. *Surg Forum* 30 (1979) 519-521
107. Kager, A.N., Marks, M., Bastrom, T., Newton, P.O. Morbidity of iliac crest bone graft harvesting in adolescent deformity surgery. *J Pediatr Orthop* 26 (2006) 132-134
108. Kakudo, N., Kushida, S., Minakata, T., Suzuki, K., Kusumoto, K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. *Med Mol Morphol* 44 (2011) 233-236
109. Kato, M., Toyoda, H., Namikawa, T., Hoshino, M., Terai, H., Miyamoto, S., Takaoka, K. Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Biomaterials* 27 (2006) 2035-2041
110. Kawai, M., Bessho, K., Kaihara, S., Sonobe, J., Oda, K., Iizuka, T., Maruyama, H. Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. *Hum Gene Ther* 14 (2003) 1547-1556
111. Kinsella, C.R., Jr., Bykowski, M.R., Lin, A.Y., Cray, J.J., Durham, E.L., Smith, D.M., DeCesare, G.E., Mooney, M.P., Cooper, G.M., Losee, J.E. BMP-2-mediated regeneration of large-scale cranial defects in the canine: an examination of different carriers. *Plast Reconstr Surg* 127 (2011) 1865-1873
112. Klein, R.M., Wolf, E.D., Wu, R., Sanford, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* 24 (1992) 384-386
113. Knowles, M.R., Noone, P.G., Hohneker, K., Johnson, L.G., Boucher, R.C., Efthimiou, J., Crawford, C., Brown, R., Schwartzbach, C., Pearlman, R. A double-blind, placebo controlled, dose ranging study to evaluate the safety and biological efficacy of the lipid-DNA complex GR213487B in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 9 (1998) 249-269
114. Kokubo, S., Fujimoto, R., Yokota, S., Fukushima, S., Nozaki, K., Takahashi, K., Miyata, K. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials* 24 (2003) 1643-1651

115. Kokubo, S., Nozaki, K., Fukushima, S., Takahashi, K., Miyata, K., Fujimoto, R., Yokota, S. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 as an Osteoinductive Biomaterial and a Biodegradable Carrier in a Rabbit Ulnar Defect Model. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 23 (2008) 348-366
116. Kolambkar, Y.M., Boerckel, J.D., Dupont, K.M., Bajin, M., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W., Guldberg, R.E. Spatiotemporal delivery of bone morphogenetic protein enhances functional repair of segmental bone defects. *Bone* 49 (2011) 485-492
117. Kolk, A. (2007) Aktuelle Aspekte der Knochenregeneration. Fakultät für Medizin. Technische Universität München
118. Kolk, A., Haczek, C., Koch, C., Vogt, S., Kullmer, M., Pautke, C., Deppe, H., Plank, C. A strategy to establish a gene-activated matrix on titanium using gene vectors protected in a polylactide coating. *Biomaterials* 32 (2011) 6850-6859
119. Kolk, A., Haczek, C., Pautke, C., Deppe, H., Vogt, S., Stemberger, A., Plank, C. Bone regeneration by non-viral BMP-2 Genetransfer: Release out of PDLLA-coated implants - In vitro and in vivo; Abstracts from the XVIIIth Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, 12-15 September 2006, Barcelona, Spain. *J Craniomaxillofac Surg* 34 Suppl 1 (2006) 1-226
120. Lamberg, A., Schmidmaier, G., Soballe, K., Elmengaard, B. Locally delivered TGF-beta1 and IGF-1 enhance the fixation of titanium implants: a study in dogs. *Acta Orthop* 77 (2006) 799-805
121. Lee, J.Y., Kim, K.H., Shin, S.Y., Rhyu, I.C., Lee, Y.M., Park, Y.J., Chung, C.P., Lee, S.J. Enhanced bone formation by transforming growth factor-beta1-releasing collagen/chitosan microgranules. *J Biomed Mater Res A* 76 (2006) 530-539
122. Lee, K., Silva, E.A., Mooney, D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface* 8 (2011) 153-170
123. Lee, K.B., Taghavi, C.E., Murray, S.S., Song, K.J., Keorochana, G., Wang, J.C. BMP induced inflammation: A comparison of rhBMP-7 and rhBMP-2. *J Orthop Res* 30 (2012) 1985-1994
124. Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130 (2007) 456-469
125. Lee, S.S., Huang, B.J., Kaltz, S.R., Sur, S., Newcomb, C.J., Stock, S.R., Shah, R.N., Stupp, S.I. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds. *Biomaterials* 34 (2013) 452-459
126. Li, Z., Zhao, Y., Yao, S., Zhao, J., Yu, S., Zhang, W. Immediate reconstruction of mandibular defects: a retrospective report of 242 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 65 (2007) 883-890
127. Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 1032-1044
128. Lienau, J., Schell, H., Duda, G.N., Seebeck, P., Muchow, S., Bail, H.J. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23 (2005) 639-645

129. Lienau, J., Schell, H., Epari, D.R., Schutze, N., Jakob, F., Duda, G.N., Bail, H.J. CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24 (2006) 254-262
130. Lin, C.C., Metters, A.T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 1379-1408
131. Linde, A., Hedner, E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int* 56 (1995) 549-553
132. Litzinger, D.C., Huang, L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim Biophys Acta* 1113 (1992) 201-227
133. Liu, J., Xu, Z., Li, D., Xu, S. [Mechanical properties and biocompatibility of nanometer calcium carbonate/poly (L-lactide) composites]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 23 (2006) 805-808
134. Liu, W., Wang, D.R., Cao, Y.L. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. *Curr Gene Ther* 4 (2004a) 123-136
135. Liu, Y., de Groot, K., Hunziker, E.B. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 36 (2005) 745-757
136. Liu, Y., Enggist, L., Kuffer, A.F., Buser, D., Hunziker, E.B. The influence of BMP-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration. *Biomaterials* 28 (2007a) 2677-2686
137. Liu, Y., Hunziker, E.B., Layrolle, P., De Bruijn, J.D., De Groot, K. Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity. *Tissue Eng* 10 (2004b) 101-108
138. Liu, Y., Huse, R.O., de Groot, K., Buser, D., Hunziker, E.B. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res* 86 (2007b) 84-89
139. Lorente, C.A., Song, B.Z., Donoff, R.B. Healing of bony defects in the irradiated and unirradiated rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 50 (1992) 1305-1309
140. Luginbuehl, V., Meinel, L., Merkle, H.P., Gander, B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2004) 197-208
141. Mai, R., Reinsdorf, A., Pilling, E., Lauer, G., Gelinsky, M., Eckelt, U. [Custom moldable hydroxyapatite collagen composite for repair of osseous defects]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9 (2005) 12-17
142. Majid, K., Tseng, M.D., Baker, K.C., Reyes-Trocchia, A., Herkowitz, H.N. Biomimetic calcium phosphate coatings as bone morphogenetic protein delivery systems in spinal fusion. *Spine J* 11 (2011) 560-567
143. Marcel, T., Grausz, J.D. The TMC Worldwide Gene Therapy Enrollment Report (June 1996). *Hum Gene Ther* 7 (1996) 2025-2046
144. Martinek, V., Latterman, C., Usas, A., Abramowitch, S., Woo, S.L., Fu, F.H., Huard, J. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 1123-1131
145. Marx, R.E. Commentary on: Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (2006) 190-191; discussion 191-192

146. Marx, R.E., Garg, A.K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 7 (1998) 267-276
147. Masuda, T., Yliheikkila, P.K., Felton, D.A., Cooper, L.F. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13 (1998) 17-29
148. Maurer, T., Zimmermann, G., Maurer, S., Stegmaier, S., Wagner, C., Hansch, G.M. Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. *Mediators Inflamm* 2012 (2012) 171209
149. Mehta, M., Schmidt-Bleek, K., Duda, G.N., Mooney, D.J. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 1257-1276
150. Meyer, U., Wiesmann, H.P., Berr, K., Kubler, N.R., Handschel, J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (2006) 899-906
151. Morin, R., Kaplan, D., Perez-Ramirez, B. Bone morphogenetic protein-2 binds as multilayers to a collagen delivery matrix: an equilibrium thermodynamic analysis. *Biomacromolecules* 7 (2006) 131-138
152. Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A., Takakura, Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 30 (2006) 115-118
153. Müller, H.-P. "Parodontologie" 2006
154. Mulligan, R.C. The basic science of gene therapy. *Science* 260 (1993) 926-932
155. Nakamura, Y., Wakitani, S., Nakayama, J., Wakabayashi, S., Horiuchi, H., Takaoka, K. Temporal and spatial expression profiles of BMP receptors and noggin during BMP-2-induced ectopic bone formation. *J Bone Miner Res* 18 (2003) 1854-1862
156. Nanney, L.B., Paulsen, S., Davidson, M.K., Cardwell, N.L., Whitsitt, J.S., Davidson, J.M. Boosting epidermal growth factor receptor expression by gene gun transfection stimulates epidermal growth in vivo. *Wound Repair Regen* 8 (2000) 117-127
157. Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F.P. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* (2012)
158. Nkenke, E., Weisbach, V., Winckler, E., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J., Neukam, F.W. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (2004) 157-163
159. Oberholzer, A., Stahel, P., Tschöke, S.K., Ertel, W. [Role of gene therapy in trauma and orthopedic surgery]. *Unfallchirurg* 109 (2006) 521-527
160. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., Tsumaki, N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res* 21 (2006) 1022-1033
161. Palmer, R.R., Lewis, A.L., Kirkwood, L.C., Rose, S.F., Lloyd, A.W., Vick, T.A., Stratford, P.W. Biological evaluation and drug delivery application of cationically modified phospholipid polymers. *Biomaterials* 25 (2004) 4785-4796
162. Parikh, S.N. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 48 (2002) 142-148

163. Park, J., Ries, J., Gelse, K., Kloss, F., von der Mark, K., Wiltfang, J., Neukam, F.W., Schneider, H. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 10 (2003) 1089-1098
164. Patel, V.V., Zhao, L., Wong, P., Pradhan, B.B., Bae, H.W., Kanim, L., Delamarter, R.B. An in vitro and in vivo analysis of fibrin glue use to control bone morphogenetic protein diffusion and bone morphogenetic protein-stimulated bone growth. *Spine J* 6 (2006) 397-403; discussion 404
165. Paul, S., Lee, J.C., Yeh, L.C. A comparative study on BMP-induced osteoclastogenesis and osteoblastogenesis in primary cultures of adult rat bone marrow cells. *Growth Factors* 27 (2009) 121-131
166. Pereira, R.C., Rydziel, S., Canalis, E. Bone morphogenetic protein-4 regulates its own expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol* 182 (2000) 239-246
167. Perri, B., Cooper, M., Laurysen, C., Anand, N. Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J* 7 (2007) 235-239
168. Peter, S.J., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 43 (1998) 422-427
169. Pollock, R., Alcelik, I., Bhatia, C., Chuter, G., Lingutla, K., Budithi, C., Krishna, M. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J* 17 (2008) 845-852
170. Premaraj, S., Mundy, B., Parker-Barnes, J., Winnard, P.L., Moursi, A.M. Collagen gel delivery of Tgf-beta3 non-viral plasmid DNA in rat osteoblast and calvarial culture. *Orthod Craniofac Res* 8 (2005) 320-322
171. Prolo, D.J., Pedrotti, P.W., Burres, K.P., Oklund, S. Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop Relat Res* (1982) 230-242
172. Prosdocimo, D.A., Jain, M.K. BMPing up angiogenesis via BMPER. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (2011) 2167-2168
173. Pulford, K.A., Sipos, A., Cordell, J.L., Stross, W.P., Mason, D.Y. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* 2 (1990) 973-980
174. Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., Marcacci, M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344 (2001) 385-386
175. Raghoobar, G.M., Liem, R.S., Bos, R.R., van der Wal, J.E., Vissink, A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res* 17 (2006) 288-293
176. Ramprasad, M.P., Fischer, W., Witztum, J.L., Sambrano, G.R., Quehenberger, O., Steinberg, D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 9580-9584
177. Ramprasad, M.P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., Steinberg, D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 14833-14838
178. Rasubala, L., Yoshikawa, H., Nagata, K., Iijima, T., Ohishi, M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 41 (2003) 173-178

179. Rawashdeh, M.A. Morbidity of iliac crest donor site following open bone harvesting in cleft lip and palate patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37 (2008) 223-227
180. Reddi, A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001) S1-6
181. Reynolds, M.A., Aichelmann-Reidy, M.E., Branch-Mays, G.L., Gunsolley, J.C. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 8 (2003) 227-265
182. Rihn, J.A., Gates, C., Glassman, S.D., Phillips, F.M., Schwender, J.D., Albert, T.J. The use of bone morphogenetic protein in lumbar spine surgery. *J Bone Joint Surg Am* 90 (2008) 2014-2025
183. Ripamonti, U., Van Den Heever, B., Sampath, T.K., Tucker, M.M., Rueger, D.C., Reddi, A.H. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors* 13 (1996) 273-289, color plates III-VIII, pre bk
184. Rose, F.R., Oreffo, R.O. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 292 (2002) 1-7
185. Rosen, V., Thies, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8 (1992) 97-102
186. Sailer, H.F., Weber, F.E. [Bone substitutes]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 1 (2000) S384-391
187. Schaaf, H., Lendeckel, S., Howaldt, H.P., Streckbein, P. Donor site morbidity after bone harvesting from the anterior iliac crest. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109 (2010) 52-58
188. Scherer, F., Schillinger, U., Putz, U., Stemberger, A., Plank, C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med* 4 (2002) 634-643
189. Schieker, M., Mutschler, W. [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 109 (2006) 715-732
190. Schliephake, H. Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14 (2010) 17-22
191. Schmidmaier, G. (2004) Einfluss der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren aus einer biodegradierbaren Poly(D,L-Laktid)-Beschichtung von Biomaterialien auf die Frakturheilung. Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité
192. Schmidmaier, G., Lucke, M., Schwabe, P., Raschke, M., Haas, N.P., Wildemann, B. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants* 16 (2006a) 61-69
193. Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., Haas, N.P., Raschke, M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 37 Suppl 2 (2006b) S105-112
194. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Cromme, F., Kandziora, F., Haas, N.P., Raschke, M. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 30 (2002) 816-822
195. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Lubberstedt, M., Haas, N.P., Raschke, M. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces

- osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65 (2003) 157-162
196. Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (1986) 299-308
197. Seeherman, H., Li, R., Bouxsein, M., Kim, H., Li, X.J., Smith-Adaline, E.A., Aiolova, M., Wozney, J.M. rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 144-160
198. Seggewiss, R., Dunbar, C.E. A new direction for gene therapy: intrathymic T cell-specific lentiviral gene transfer. *J Clin Invest* 115 (2005) 2064-2067
199. Shields, L.B., Raque, G.H., Glassman, S.D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J., Shields, C.B. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 31 (2006) 542-547
200. Silva, J.F., Cyrino, F.Z., Breitenbach, M.M., Bouskela, E., Carvalho, J.J. Vimentin and laminin are altered on cheek pouch microvessels of streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Clinics (Sao Paulo)* 66 (2011) 1961-1968
201. Simmons, D.J. "Fracture healing" J. B. Lippincott, Philadelphia, 1980
202. Simpson, A.H., Mills, L., Noble, B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 88 (2006) 701-705
203. Skalli, O., Pelte, M.F., Pecllet, M.C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M., Orci, L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 37 (1989) 315-321
204. Slavkin, H.C., Hu, C.C., Sakakura, Y., Diekwisch, T., Chai, Y., Mayo, M., Bringas, P., Jr., Simmer, J., Mak, G., Sasano, Y., et al. Gene expression, signal transduction and tissue-specific biomineralization during mammalian tooth development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2 (1992) 315-329
205. Smith, D.M., Afifi, A.M., Cooper, G.M., Mooney, M.P., Marra, K.G., Losee, J.E. BMP-2-based repair of large-scale calvarial defects in an experimental model: regenerative surgery in cranioplasty. *J Craniofac Surg* 19 (2008) 1315-1322
206. Smucker, J.D., Rhee, J.M., Singh, K., Yoon, S.T., Heller, J.G. Increased swelling complications associated with off-label usage of rhBMP-2 in the anterior cervical spine. *Spine (Phila Pa 1976)* 31 (2006) 2813-2819
207. Sommer, B., Bickel, M., Hofstetter, W., Wetterwald, A. Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 19 (1996) 371-380
208. Stein, U. (2001) Die Rolle der Perizyten in der Osteogenese der heterotopen Ossifikation. Institut für Pathologie der Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum Bochum, pp 1-102
209. Stöhrer, M. (2009) Aktuelle Aspekte der histomorphometrischen, histologischen und mikroradiographischen Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation des rekombinanten Proteins BMP-2 versus Nukleinsäuretransfers : eine tierexperimentelle Studie. Medizinische Dissertation. Technische Universität München München, p 120
210. Strobel, C., Bormann, N., Kadow-Romacker, A., Schmidmaier, G., Wildemann, B. Sequential release kinetics of two (gentamicin and BMP-2) or three

- (gentamicin, IGF-I and BMP-2) substances from a one-component polymeric coating on implants. *J Control Release* 156 (2011a) 37-45
211. Strobel, C., Schmidmaier, G., Wildemann, B. Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer. *Int J Artif Organs* 34 (2011b) 304-316
212. Strobl, H., Scheinecker, C., Csmarits, B., Majdic, O., Knapp, W. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br J Haematol* 90 (1995) 774-782
213. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, N., Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 140 (1999) 2125-2133
214. Swaminathan, R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 313 (2001) 95-105
215. Swiontkowski, M.F., Aro, H.T., Donell, S., Esterhai, J.L., Goulet, J., Jones, A., Kregor, P.J., Nordsletten, L., Paiement, G., Patel, A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 88 (2006) 1258-1265
216. Takagi, K., Urist, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 196 (1982) 100-109
217. Takahashi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 26 (2005a) 4856-4865
218. Takahashi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 26 (2005b) 3587-3596
219. Tatum, E.L. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 10 (1966) 19-32
220. Terheyden, H., Jepsen, S. Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine. *Grundlagen und klinische Anwendung. Implantologie* 4 (1999) 359-378
221. Theyse, L.F., Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., van Doorn, J., Dhert, W.J., Hazewinkel, H.A. Growth hormone stimulates bone healing in a critical-sized bone defect model. *Clin Orthop Relat Res* 446 (2006) 259-267
222. Tomford, W.W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 77 (1995) 1742-1754
223. Torroni, A., Gennaro, P., Aboh, I.V., Longo, G., Valentini, V., Iannetti, G. Microvascular reconstruction of the mandible in irradiated patients. *J Craniofac Surg* 18 (2007) 1359-1369
224. Toth, J.M., Boden, S.D., Burkus, J.K., Badura, J.M., Peckham, S.M., McKay, W.F. Short-term osteoclastic activity induced by locally high concentrations of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a cancellous bone environment. *Spine (Phila Pa 1976)* 34 (2009) 539-550
225. Trombelli, L., Heitz-Mayfield, L.J., Needleman, I., Moles, D., Scabbia, A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3 (2002) 117-135; discussion 160-112

226. Tzafiriri, A.R., Lerner, E.I., Flashner-Barak, M., Hinchcliffe, M., Ratner, E., Parnas, H. Mathematical modeling and optimization of drug delivery from intratumorally injected microspheres. *Clin Cancer Res* 11 (2005) 826-834
227. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (1965) 893-899
228. Vaidya, R., Carp, J., Sethi, A., Bartol, S., Craig, J., Les, C.M. Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Eur Spine J* 16 (2007) 1257-1265
229. Valentini, V., Cassoni, A., Marianetti, T.M., Romano, F., Terenzi, V., Iannetti, G. Reconstruction of craniofacial bony defects using autogenous bone grafts: a retrospective study on 233 patients. *J Craniofac Surg* 18 (2007) 953-958
230. van Midwoud, P.M., Merema, M.T., Verpoorte, E., Groothuis, G.M. Microfluidics enables small-scale tissue-based drug metabolism studies with scarce human tissue. *J Lab Autom* 16 (2011) 468-476
231. Varkey, M., Gittens, S.A., Uludag, H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 1 (2004) 19-36
232. Ventriglia, G. Osteoklasten und deren Progenitorzellen im Mittelohrcholesteatom. (2003)
233. Vergnaud, P., Garnero, P., Meunier, P.J., Breart, G., Kamihagi, K., Delmas, P.D. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 719-724
234. Villavicencio, A.T., Burneikiene, S., Nelson, E.L., Bulsara, K.R., Favors, M., Thramann, J. Safety of transforaminal lumbar interbody fusion and intervertebral recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Neurosurg Spine* 3 (2005) 436-443
235. Wallace, A.L., Draper, E.R., Strachan, R.K., McCarthy, I.D., Hughes, S.P. The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res* (1994) 281-290
236. Warnke, P.H., Springer, I.N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmoller, M., Russo, P.A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., Terheyden, H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364 (2004) 766-770
237. Waterhouse, J.E., Harbottle, R.P., Keller, M., Kostarelos, K., Coutelle, C., Jorgensen, M.R., Miller, A.D. Synthesis and application of integrin targeting lipopeptides in targeted gene delivery. *Chembiochem* 6 (2005) 1212-1223
238. Weber, F.E., Eyrich, G., Gratz, K.W., Maly, F.E., Sailer, H.F. Slow and continuous application of human recombinant bone morphogenetic protein via biodegradable poly(lactide-co-glycolide) foamspheres. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 (2002) 60-65
239. Webster, A., Dyer, C., Haswelland, S., Greenman, J. A microfluidic device for tissue biopsy culture and interrogation. *Analytical Methods* (2010) 1005-1007
240. Weitz, J., Kolk, A., Probst, F., Koch, C., Bauer, F., Pautke, C., Hölzle, F., Wolff, K.D., Plank, C. Bioactive nucleic-acid coatings for implants as an innovative approach for difficult bone conditions—an experimental study in minipigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 38 (2009) 527-528
241. Wickham, T.J., Carrion, M.E., Kovesdi, I. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther* 2 (1995) 750-756
242. Wikesjo, U.M., Qahash, M., Polimeni, G., Susin, C., Shanaman, R.H., Rohrer, M.D., Wozney, J.M., Hall, J. Alveolar ridge augmentation using implants

- coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol* 35 (2008) 1001-1010
243. Wildemann, B., Lange, K., Strobel, C., Fassbender, M., Willie, B., Schmidmaier, G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 42 (2011) 746-752
244. Wildemann, B., Sander, A., Schwabe, P., Lucke, M., Stockle, U., Raschke, M., Haas, N.P., Schmidmaier, G. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable poly(D,L-lactide)--growth factor coating for orthopaedic implants. *Biomaterials* 26 (2005) 4035-4040
245. Wiley Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials. *The Journal of Gene Medicine* (2008)
246. Wilson-Hench, J. "Osteoinduction" Elsevier, Amsterdam, 1987
247. Wissing, H. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 212 (1990) 479-488
248. Wong, C., Inman, E., Spaethe, R., Helgerson, S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost* 89 (2003) 573-582
249. Wongchuensoontorn, C., Liebehenschel, N., Schwarz, U., Schmelzeisen, R., Gutwald, R., Ellis, E., 3rd, Sauerbier, S. Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report. *J Craniomaxillofac Surg* 37 (2009) 155-161
250. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242 (1988) 1528-1534
251. Würzler, K.-K. (2004) Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten. University of Würzburg Würzburg, p 133
252. Würzler, K.K., Heisterkamp, M., Bohm, H., Kubler, N.R., Sebald, W., Reuther, J.F. [Mandibular reconstruction with autologous bone and osseoinductive implant in the Gottingen minipig]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8 (2004) 75-82
253. Wutzl, A., Rauner, M., Seemann, R., Millesi, W., Krepler, P., Pietschmann, P., Ewers, R. Bone morphogenetic proteins 2, 5, and 6 in combination stimulate osteoblasts but not osteoclasts in vitro. *J Orthop Res* 28 (2010) 1431-1439
254. Yamamoto, M., Takahashi, Y., Tabata, Y. Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Eng* 12 (2006) 1305-1311
255. Yang, X.B., Whitaker, M.J., Sebald, W., Clarke, N., Howdle, S.M., Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O. Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. *Tissue Eng* 10 (2004) 1037-1045
256. Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M., Robey, P.G. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* (1992) 275-294
257. Zhang, H., Sucato, D.J., Welch, R.D. Recombinant human bone morphogenic protein-2-enhanced anterior spine fusion without bone encroachment into the spinal canal: a histomorphometric study in a thoracoscopically instrumented porcine model. *Spine* 30 (2005) 512-518
258. Zhang, H.G., Zhou, T., Yang, P., Edwards, C.K., 3rd, Curiel, D.T., Mountz, J.D. Inhibition of tumor necrosis factor alpha decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver. *Hum Gene Ther* 9 (1998) 1875-1884

259. Zhou, H., Choong, P., McCarthy, R., Chou, S.T., Martin, T.J., Ng, K.W. In situ hybridization to show sequential expression of osteoblast gene markers during bone formation in vivo. *J Bone Miner Res* 9 (1994) 1489-1499
260. Zhou, H., Qian, J., Wang, J., Yao, W., Liu, C., Chen, J., Cao, X. Enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with low dose of 2-N, 6-O-sulfated chitosan in vitro and in vivo. *Biomaterials* 30 (2009) 1715-1724

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	3-Dimensionale Struktur eines BMP-2 Moleküls (Quelle: ProteinDataBank)	5
Abbildung 2:	Für die Gentherapie werden Vektor und die DNA-Sequenzen von Promotor bzw. Transgen benötigt [Oberholzer 2006]	8
Abbildung 3:	Operationsablauf (Kolk 2007)	17
Abbildung 4:	Mikroskop mit angeschlossenenem Rechner	22
Abbildung 5:	ROIs (region of interest) in schematischer Darstellung	22
Abbildung 6:	Screenshot der angezeichneten Fläche im Schnitt	23
Abbildung 7:	Osteocalcin-Färbung (Vergrößerung 200-fach; 324L)	24
Abbildung 8:	Mittelwerte der Osteocalcinexpression im Randbereich des critical size Defekts (linke Abb.) und zentral (rechte Abb.)	25
Abbildung 9:	CD68-Färbung (Vergrößerung 40-fach; S5 li)	27
Abbildung 10:	Mittelwerte der CD68-Expression im Randbereich des critical size Defekts (linke Abb.) und zentral (rechte Abb.)	28
Abbildung 11:	HE-Färbung (Vergrößerung 10-fach; 291L)	30
Abbildung 12:	Mittelwerte der Gefäßanzahl im Randbereich des critical size Defekts (links) und zentral (rechts)	31
Abbildung 13:	TRAP-Färbung (links G50L, 200x; rechts 9R40, 200x)	38
Abbildung 14:	Immunhistochemische Färbung mit alpha-SMA (Vergrößerung 40-fach; W445li)	40
Abbildung 15:	Immunhistochemische Färbung mit alpha-SMA (Ausschnitt aus Abb. 14, Vergrößerung 200-fach)	41
Abbildung 16:	HE-Färbung (Vergrößerung 10-fach, 291)	41
Abbildung 17:	HE-Färbung (Ausschnitt aus Abb. 16, Vergrößerung 50-fach)	42

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vor- und Nachteile der am häufigsten verwendeten Vektoren [Oberholzer 2006]	8
Tabelle 2:	verwendete Antikörper	20
Tabelle 3:	Gruppenvergleich Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	26
Tabelle 4:	Gruppenvergleich Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	26
Tabelle 5:	Gruppenstatistiken Osteocalcin Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	26
Tabelle 6:	Gruppenstatistiken Osteocalcin Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	27
Tabelle 7:	Gruppenvergleich CD68 Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	29
Tabelle 8:	Gruppenvergleich CD68 Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	29
Tabelle 9:	Gruppenstatistiken CD68 Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	29
Tabelle 10:	Gruppenstatistiken CD68 Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	30
Tabelle 11:	Gruppenvergleich Gefäße Randbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	32
Tabelle 12:	Gruppenvergleich Gefäße Zentralbereich mit Signifikanz und Standardfehler der Differenz	32
Tabelle 13:	Gruppenstatistiken Gefäße Randbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	32
Tabelle 14:	Gruppenstatistiken Gefäße Zentralbereich mit Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts	33

10 Abkürzungsverzeichnis

BMP	bone morphogenetic protein
CD	cluster of differentiation
COPROG	Copolymer protected Gene Vector
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
PBS-Puffer	Phosphate buffered saline
PDLLA	Poly-D,L-Laktid
rh	rekombinant human
ROI	Region of interest
SMA	smooth muscle actin
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
VE-Wasserbad	voll entmineralisiertes Wasserbad

11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. B. Gänsbacher vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München und Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. K.-D. Wolff, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie der TU München für die Möglichkeit, die Arbeit an deren Institut bzw. Klinik durchführen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer und Kollegen Herrn Privatdozent Dr. Dr. A. Kolk für die Vergabe des Themas, Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit sowie Herrn Privatdozent Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München für die Bereitstellung der von ihm entwickelten Vektortechnologie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei den Mitarbeitern der Pathologie Starnberg, insbesondere Frau Brunner, möchte ich mich für die großartige Unterstützung bei Herstellung und Färbung der Schnitte bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Martijn van Griensven und Frau Marina Unger vom Labor der Experimentellen Unfallchirurgie für die Möglichkeit der Auswertung der Schnitte an deren Mikroskop.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner großartigen Familie und meiner Frau bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und zu jeder Zeit den Rücken freigehalten haben.

12 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Weitz

Vorname: Jochen

Geburtsdatum: 6. April 1978

Geburtsort: München

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Gebelestraße, München

1988 – 1992 Wilhelmsgymnasium München

1992 – 1997 Luisengymnasium München

28.05.1997 Abitur

Zivildienst:

1997 – 1998 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst in München

Hochschulstudium:

30.10.1998 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

14.10.1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

03.04.2001 Zahnärztliche Vorprüfung

14.01.2004 Zahnärztliche Prüfung

25.10.2004 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München

30.11.2004 Promotion zum Dr. med. dent.

26.03.2005 Ärztliche Vorprüfung

01.04.2005 bis

24.10.2008 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München,
Harvard Medical School, Boston, USA und Universidad de Buenos Aires, Argentinien

24.10.2008 Staatsexamen Medizin an der Technischen Universität München

seit

02/2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer
und Gesichtschirurgie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

03/2014 Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie