

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für

Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)

**Auswertung einer polychromen Sequenzmarkierung sowie
Etablierung eines neuen Fluorochromschemas zur
Untersuchung der Knochenaktivität nach
non-viralem Gentransfer von BMP-2-Plasmid
am critical-size-defect des Rattenunterkiefers
mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie**

Dr. Kilian Kreutzer

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 06.06.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013 angenommen.

Für meinen Vater zum 70. Geburtstag

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochenheilung	1
1.1.1	Knochendefekte	1
1.1.2	Knochenaufbau	3
1.1.3	Defektheilung und Knochenregeneration	4
1.1.4	Osseointegration	6
1.2	Wachstumsfaktoren	9
1.2.1	Bone Morphogenetic Proteins	10
1.3	Gentransfer	11
1.3.1	Viraler Gentransfer	13
1.3.2	Nicht-viraler Gentransfer	14
1.3.2.1	Selbstaggregierende Komplexe	15
1.3.2.2	PDLLA als biodegradierbare Beschichtung	16
1.4	Polychrome Sequenzmarkierung	16
1.4.1	Technik der polychromen Sequenzmarkierung	16
1.4.2	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	18
2	Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit	20
2.1	Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop	20
2.2	Zeitlicher Ablauf der Knochenheilung unter Einfluss von rhBMP-2 aus non-viralem Gentransfer	21
3	Material und Methode	22
3.1	Polychrome Sequenzmarkierung und CLSM	22
3.1.1	Fluorochrome	22
3.1.2	Polychrome Sequenzmarkierung	23
3.1.3	Herstellung der histologischen Präparate	23
3.1.4	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	24
3.2	Tierversuch	26
3.2.1	Aufbau und Einteilung	27
3.2.2	Haltung und Ernährung	28
3.2.3	Operationstechnik	28
3.2.4	Postoperative Versorgung	29

3.2.5	Polychrome Sequenzmarkierung im Tierversuch	31
3.2.6	Tötung und Präparation	31
3.2.7	Auswertung	31
3.2.8	Statistische Auswertung	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung und der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie	34
4.2	Ergebnisse Tierversuch	39
4.2.1	Ergebnisse Gruppe rhBMP-2	41
4.2.2	Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 2,5µg	42
4.2.3	Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 12,5µg	42
4.2.4	Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 25µg	42
4.2.5	Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 50µg	43
4.2.6	Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 100µg	43
5	Diskussion	45
5.1	Diskussion der Methodik	45
5.2	Diskussion der Ergebnisse des in vivo Versuchs	52
6	Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis	61
8	Anhang	77
8.1	Absolutwerte	77
8.1.1	Signifikanzniveau der Absolutwerte	78
8.2	Prozente absolut	79
8.2.1	Signifikanzniveau der Prozente absolut	80
8.3	Prozente kumulativ	81
8.3.1	Signifikanzniveau der Prozente kumulativ	82
9	Danksagung	83
10	Curriculum vitae	84

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Frakturheilungsphasen	5
Abb. 1-2	Varianten des Gentransfers	12
Abb. 1-3	Viraler Gentransfer	13
Abb. 1-4	Aufbau COPROGS	15
Abb. 1-5	Schematische Darstellung eines Konfokalen Mikroskops	18
Abb. 2-1	Problem der Überlagerung	20
Abb. 3-1	Innenlochsäge	24
Abb. 3-2	Orientierung der Präparate	24
Abb. 3-3	LSM 510 META NLO [Gábor 2011]	25
Abb. 3-4	Lambda Stack von 410-660nm	25
Abb. 3-5	Übergangszone PDLLA – Titan	27
Abb. 3-6	Ablauf der Operation [Kolk 2007]	30
Abb. 3-7	Auswertungsverfahren der polychromen Sequenzmarkierung	32
Abb. 3-8	Kontrastverstärkung und Anpassung der Sättigung	33
Abb. 3-9	Monochromatische Umwandlung	33
Abb. 3-10	automatische Flächenberechnung	33
Abb. 4-1	Exzitationsspektren	34
Abb. 4-2	Emissionsspektren	34
Abb. 4-3	3D Darstellung	37
Abb. 4-4	3D Rekonstruktion	37
Abb. 4-5	Linear Unmixing	38
Abb. 4-6	Wachstumsaktivität zu Untersuchungszeitpunkten	39
Abb. 4-7	Kumulative Wachstumsaktivität zu Untersuchungszeitpunkten	40
Abb. 5-1	Basisformen der Knochenwachstumsaktivität bei verschiedenen Abläufen der Osteoinduktion im Rahmen dieser Versuchsanordnung	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1	Fluorochrome	22
Tab. 3-2	MMA-Einbettverfahren der Anatomischen Anstalt München	23
Tab. 3-3	Spezifikation des LSM 510 META NLO des LMC der ETH Zürich	26
Tab. 3-4	Gruppeneinteilung	27
Tab. 3-5	Fluorochromschema	31
Tab. 4-1	Exzitations- und Emissionsmaxima	35
Tab. 8-1	Fläche des neu gebildeten Knochens in μm^2 an den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	77
Tab. 8-2	Signifikanzniveaus der Absolutwerte der Fläche des neu gebildeten Knochens zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	78
Tab. 8-3	Prozentuale Verteilung der Knochenneubildung zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	79
Tab. 8-4	Signifikanzniveaus der prozentualen Verteilung des Knochenwachstums zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	80
Tab. 8-5	Kumulative prozentuale Verteilung der Knochenneubildung zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	81
Tab. 8-6	Signifikanzniveaus der kumulativen prozentualen Verteilung des Knochenwachstums zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27	82

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
μ	(Präfix) mikro
3D	dreidimensional
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	Automatic Component Extraction
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BMP	bone morphogenetic protein
C	Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
COPROG	Copolymer protected gene vector
CSD	critical size defect
D	Tag
Da	Dalton
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
Em	Emission
Excit	Exzitation
Fa.	Firma
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GAM	Gen-Aktivierte-Matrix
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HBO	Quecksilberdrahtbogenlampe
IGF	insulin-like growth factors
Inc.	Incorporated
Kap.	Kapitel
k	(Präfix) kilo
KG	Körpergewicht

l	Liter
LMC	Light Microscopy Centre
LSM	Laser Scanning Mikroskop
m	(Präfix) milli
m	Meter
min	Minute
MMA	Methylmethacrylat
n	(Präfix) nano
NA	Numerische Apertur
NaHCl ₃	Natriumhydrochlorid
NLO	Nicht Lineare Optik
PDGF	platelet derived growth factor
PDLLA	Poly (D,L-Laktid)
PEI	Polyethylenimin
pH	potentia hydrogenii
PROCOP	protective copolymer
REM	Raster Elektronen Mikroskop
rh	rekombinantes humanes
ROI	Region-of-interest
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TU	Technische Universität
UV	Ultraviolett
V.	Vena
v.o.n.u.	von oben nach unten
VEGF	vascular endothelial growth factor
WF	Wachstumsfaktoren

1 Einleitung

1.1 Knochenheilung

1.1.1 Knochendefekte

Die Erforschung der Knochenheilung ist für alle Disziplinen, die sich mit der Versorgung von Frakturen und Knochendefekten beschäftigen von Interesse. Die Unfallchirurgie, die Orthopädie und die Sportorthopädie stehen dabei traditionell im Zentrum der Behandlung. Für spezielle Fragestellungen, etwa bei Verletzungen im Gesichtsbereich, der Kalotte oder Wirbelsäule, liegt die operative Verantwortung jedoch auch bei Disziplinen der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und der Neurochirurgie. Besteht der Bedarf an einer Rekonstruktion von Hartgewebe, muss auch auf die Möglichkeiten der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie zurückgegriffen werden.

Die konventionelle Frakturversorgung nach einem Trauma beruht auf dem Prinzip der Reposition und Ruhigstellung der Knochenfragmente. Dies wird entweder durch äußere Ruhigstellung der Knochenfragmente oder eine offene funktionsstabile Osteosynthese erreicht [Einhorn 1995, Novicoff 2008]. Das Ziel dieser Behandlung stellt die organotypische Regeneration (*Restitutio ad integrum*) dar. Dabei kommt es zu einer Konsolidierung im Defektbereich durch neu gebildeten Knochen und nicht durch minderwertiges Narbengewebe [McKibbin 1978].

Ähnliches gilt für die Versorgung pathologischer Frakturen, die nach einer inadäquaten Belastung des Knochens entstehen. Dieser Frakturmechanismus tritt oft bei Patienten mit Osteoporose, mit ossären Metastasen (Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Plasmozytom) [Bouxsein 2004, Scharschmidt 2011, Sturge 2011] oder im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich bei Patienten mit fortgeschrittener Atrophie des Unterkiefers auf. Als sekundäre Krankheitsfolgen sind pathologische Frakturen bei Patienten nach Strahlentherapie (Osteoradionekrose) und unter Bisphosphonattherapie (Osteochemonekrose) zu werten [Abu-Id 2006, Cannon 2008, Otto 2011].

Eine gänzlich andere Situation stellt sich nach einer iatrogenen Unterbrechung der Knochenkontinuität dar. Diese meistens als Osteotomie durchgeführten Eingriffe basieren auf der Durchtrennung von biologisch gesundem Knochen und Osteosynthese der Fragmente in einer funktionell und anatomisch korrekten Position. In der Orthopädie seien hier exemplarisch das Verfahren der Beckenosteotomie zur Hüftpfannenrekonstruktion und, in Kombination mit der Distraktionsosteogenese, die Röhrenknochenverlängerung nach Ilizarov genannt [Ilizarov 1990]. Auf dem Gebiet der Kieferchirurgie findet

dieses Verfahren im Rahmen von Dysgnathieoperationen und bei der Behandlung von Kindern mit Kraniosynostosen Anwendung [Obwegeser 2007].

Hat das Ausmaß eines Knochensubstanzdefektes eine kritische Größe überschritten, kommt es zu keiner knöchernen Regeneration im Defektbereich [Hedner 1995, Schmitz 1986]. Insbesondere im Gesichtsbereich mit seinem hohen ästhetischen und funktionellen Wert werden in diesen Fällen umfangreiche Rekonstruktionsmaßnahmen notwendig. Diese betreffen alle Bereiche des mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Fachgebiets wie die Rekonstruktion des Viszerocraniums [Horch 2006, Meyer 2006], des Neurocraniums [Schmelzeisen 1998, Williams 1999], des Alveolarfortsatzes bei Kieferspalten [Chiu 2010, Deppe 2004a, Williams 1999] und des Alveolarfortsatzes im Rahmen der präprothetischen Chirurgie [Horch 2006, Williams 1999]. Hierbei ist die Rekonstruktion mit autologem Knochen, welcher entweder als avaskuläres freies Transplantat oder als mikrovasculär anastomosiertes Transplantat im Defektbereich eingebracht wird zu bevorzugen. Alternativ stehen auch Rekonstruktionsverfahren mit allogenen, xenogenen oder alloplastischen Materialien zur Verfügung [Bak 2010, Brown 2010]. Die Rekonstruktion mit körpereigenem Gewebe ist ein anspruchsvolles operatives Verfahren und mit einer nicht zu vernachlässigen Morbidität in der Empfänger- und der Spenderregion behaftet. [Meyer 2006, Pattani 2010].

In etwa 10% der Frakturen kommt es zu einer verzögerten (delayed-union) bis unvollständigen (non-union) Knochenheilung [Evans 2010]. Insbesondere bei Patienten mit einem reduzierten Knochenmetabolismus in der Defektregion ist die Erfolgsrate osteosynthetischer, augmentativer und rekonstruktiver Behandlungen reduziert. Zu diesem Patientenklitel müssen Patienten mit systemischen Vorerkrankungen (z.B. Diabetes, Hyperparathyreodismus, Vitamin-D-Mangel), nach Malignommanifestation, nach Strahlentherapie (Osteoradionekrose), mit chronisch entzündlichen Prozessen (Osteomyelitis, Osteochemonekrose) und mit degenerativen Knochenerkrankungen (z.B. Osteoporose) im Defektbereich gerechnet werden. Während bei diesen Patienten das komplikationslose Einheilen von autologem Knochen, insbesondere nach mikrovasculärer Anastomosierung, ein realistisches Behandlungsziel darstellt, ist die Indikation zur Insertion alloplastischer Materialien, z.B. dentaler Implantate, äußerst streng zu stellen. Die Verbesserung und Beschleunigung der Osseointegration von autologem Knochen und alloplastischem Materialien stellt eine große Herausforderung dar.

Völlig neue Aspekte und Ansprüche an die Knochenheilung und Osseointegration traten mit der Entwicklung von Implantaten auf, die nach ihrer Einheilung nicht von körpereigenem Gewebe umgeben waren, sondern die Schleimhäute und später auch die äußere Haut dauerhaft perforierten. Im Rahme der Frakturversorgung mittels Fixateur externe war eine temporäre Perforation der Haut von alloplastischen Material seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt [Malgaigne 1847] und seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts etabliert [Freeman 1919, Parkhill 1897]. Mit Entwicklung der dentalen Implantologie [Branemark 1983b] war die Notwendigkeit zur Optimierung der dauerhaften Kontaktfläche zwischen Haut, Implantat und Knochen (Interface) gegeben [Branemark 1982]. Trotz einer guten immunologischen Abwehrlage im Bereich der Mundschleimhäute trat analog zur Parodontitis das Problem der Periimplantitis auf. Hierbei kommt es zu einer chronischen bakteriellen Entzündung der periimplantären Hart- und Weichgewebe, die konsekutiv zu einem Verlust des stabilen Implantatinterfaces führt [Lindhe 1998]. Die Verlustrate enossaler Implantate beträgt innerhalb von 10 Jahren etwa 15%, wobei die Inzidenz der Periimplantitis bei 8-30% liegt. [Pjetursson 2004, Roos-Jansaker 2006]. Die aufwendige Behandlung der intraoralen Periimplantitis [Deppe 2007] zeigt, dass eine Optimierung des körpereigenen Knochen-Implantat-Interfaces durch zusätzliche exogene Stimulation notwendig ist.

Auf Grundlage der intraoralen Implantologie kam es zur Entwicklung der extraoralen Implantatprothetik zur Verankerung von Epithesen zum Ersatz von Ohr, Auge und Nase [Holgers 1988]. Trotz deutlich geringerer Keimbesiedelung und mechanischer Belastung der extraoralen Implantate zeigte sich auch hier nach 3 Jahren in ca. einem Viertel der Fälle eine periimplantäre Entzündung [Karakoca 2008]. Mit der Entwicklung der transdermalen Extremitätenprothesen wird einem verlässlichen Haut-Implantat-Knochen-Interface auch in der Allgemeinchirurgie [Aschoff 2009, Sullivan 2003] und Handchirurgie [Manurangsee 2000] eine neue Bedeutung zuteil. Die Anwendung beschichteter Biomaterialien zur Verbesserung und Beschleunigung der Osseointegration durch Freisetzung von osteoinduktiven Substanzen (z.B. Wachstumsfaktoren oder deren Plasmide) an der Implantatoberfläche stellt einen vielversprechenden neuen Ansatz dar [Deppe 2003a, Lamberg 2006, Schillinger 2008a].

1.1.2 Knochenaufbau

Abgeleitet von der Funktion als Stützskelett und Schutzraum der inneren Organe muss der menschliche Knochen verschiedenen mechanischen Kräften widerstehen. Während axiale Druck- und Zugspannungen gut kompensiert werden können, stellen Torsions- und

Scherspannungen eine hohe Belastung dar. Die mechanischen Eigenschaften des Knochens wie Elastizität und Härte unterliegen dabei alters-, belastungs- und stoffwechselabhängigen Veränderungen. Angeborene Erkrankungen wie die Osteogenesis imperfecta [Lopez-Arcas 2009] oder die Fibrodysplasia ossificans progressiva [Billings 2008] zeigen überdeutlich die Auswirkungen von Störungen der Knochenbildung.

Menschlicher Knochen besteht zu 65% aus anorganischen Mineralstoffen, zu 25% aus organischer Matrix und zu 10% aus Wasser. Hauptbestandteil des Mineralanteils des Knochens ist nanokristallines Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Die Knochenmatrix, d.h. der mineral- und wasserfreie organische Knochenanteil, setzt sich zu 95% aus Kollagen (I, V) und zu 5% aus der nicht-kollagenen Matrix zusammen. Zu Letzterer zählen neben Proteoglycanen, Glycoproteinen und Serumproteinen auch die Wachstumsfaktoren [Young 2003].

Knochen ist ein dynamisches Gewebe mit einem Gleichgewicht der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität [Mirtz 2011]. Durch die spezielle Anordnung von Hydroxylapatit und Kollagenfibrillen erhält der Knochen seine Festigkeit. Dabei vermitteln die organischen Anteile im Knochen die Biege- und Zugfestigkeit und der Mineralanteil die Druckstabilität [McKibbin 1978]. Durch die Ausrichtung der trabekulären Knochenstrukturen entlang der Trajektorien kann sich der Knochen auf veränderte funktionelle Belastungen einstellen. [Ferretti 2003, Frost 1987].

1.1.3 Defektheilung und Knochenregeneration

Frakturheilung ist ein biologischer Prozess, der in der Konsolidierung des Knochens hinsichtlich Struktur und Funktion besteht [Mognetti 2011]. Für die Beurteilung von Knochendefekten haben sich drei Parameter als relevant für Wahl des therapeutischen Vorgehens und entscheidend für die Erfolgsaussichten der Defektheilung erwiesen: Die *mechanische* Stabilität der begrenzenden Knochenfragmente bzw. die *interfragmentäre Beweglichkeit*, die Defektgröße bzw. die *interfragmentäre Distanz* sowie die *Qualität der umliegenden Weichteile* sowohl für die Abdeckung als auch für die Versorgung der Defektzone. Überschreitet einer dieser Parameter die kritische Grenze, ist eine Spontanheilung nicht mehr möglich.

Bei der Frakturheilung unterscheidet man die primäre und die sekundäre Heilung. Die primäre Regeneration wird nur bei ausreichender Blutversorgung und absoluter Ruhigstellung der nicht dislozierten bzw. exakt repositionierten Knochenfragmente erreicht. Sie verläuft ohne Kallusbildung, der Frakturspalt wird hier wie beim physiologischen Knochenumbau durch in Längsrichtung vorwachsende Osteone überbrückt [McKibbin 1978].

Die Knochenbruchheilung wird durch zahlreiche lokal und systemisch wirkende Mechanismen gesteuert. Zeitlich und räumlich begrenzte Interaktionen von Osteoblasten mit der extrazellulären Matrix, sowie mit Hormonen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren sind beschrieben [Abe 2000, Abiraman 2002, Akizuki 1997, Alden 1999].

Die häufigere Form der Knochenbruchheilung ist die sekundäre Heilung, welche in drei Phasen gegliedert werden kann (Abb. 1-1) [Wilkins 2005]:

1. Entzündungsphase
2. Reparative Phase
3. Remodellierungsphase

Initial wird in der Entzündungsphase der Frakturspalt bzw. der Knochendefekt mit einem Hämatom aufgefüllt, in das Entzündungszellen, Makrophagen und Thrombozyten einwandern. [Barnes 1999]. Die Organisation des Hämatoms erfolgt durch Einsprossen von Fibroblasten, Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und pluripotenten Stammzellen mesenchymaler Herkunft. Es kommt zu einer Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, die den Heilungsprozess durch Steuerung der Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung einleiten [Einhorn 1998].

Während der reparativen Phase erfolgt über einen Zeitraum von 4-6 Wochen die Knochenbildung durch direkte, sog. desmale Ossifikation oder durch indirekte, sogenannte chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation wird eine bindegewebige Matrix gebildet, während sich bei der chondralen Ossifikation eine Knorpelmatrix ausformt. Diese wird zunächst in unreifen Faser- oder Geflecht-knochen mit groben und meist nicht ausgerichteten Kollagenfibrillenbündeln umgewan-

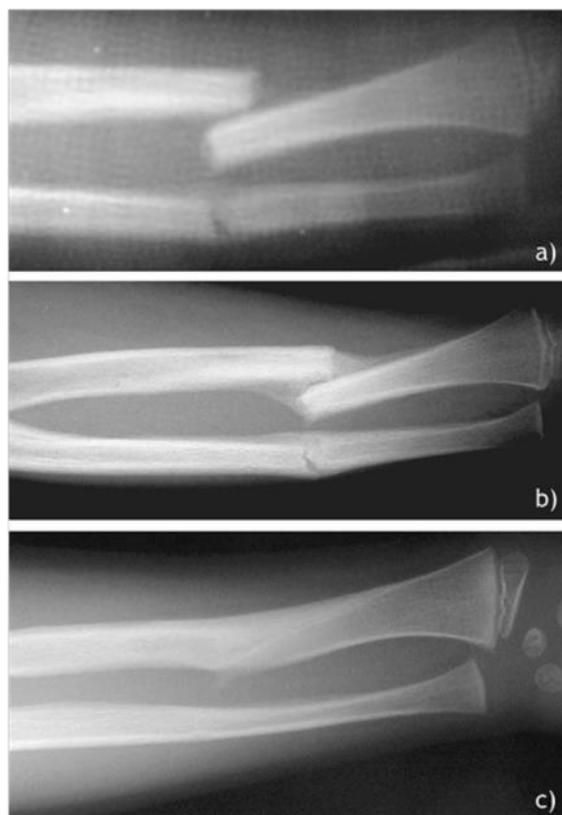


Abb. 1-1 Frakturheilungsphasen
am Beispiel einer doppelten Unterschenkel-fraktur bei einem Kind:

1. Entzündungsphase mit Hämatombildung, initiale posttraumatische Dislokation
2. Reparative Phase, nach 8 Wochen inter-fragmätäre Kallusbildung
3. Remodellierungsphase, nach 18 Monaten Remodellierung des Knochens entlang der Belastungslinien [Wilkins 2005]

delt (primäre Ossifikation). Das Ziel dieser Phase ist die zügige Überbrückung des Defektbereiches und Stabilisierung der Knochenfragmente durch einen die Fraktur ummantelnden, bindegewebigen Kallus.

Im Rahmen der Remodellierungsphase wird der Faser- oder Geflechtknochen unter funktioneller Beanspruchung durch reifen, hochwertigen Lamellenknochen (Schalen-, Ersatzknochen) mit Periost und Endost ersetzt (sekundäre Ossifikation) und ggf. der Kallus in eine mineralisierte, reife Knochenmatrix, den Fixationskallus umgebaut. Während dieser Umbauphase, dem sogenannten Remodelling, welches weitere 3-4 Monate in Anspruch nimmt, wird durch interstitielles und appositionelles Knochenwachstum der Lamellenknochen in Form und Funktion an die umgebenden Knochenverhältnisse angepasst [Wilkins 2005].

Werden während der primären oder sekundären Knochenheilung die Grenzwerte für die oben beschriebenen Parameter (interfragmentäre Beweglichkeit, interfragmentäre Distanz, Qualität der umliegenden Weichteile) verletzt, ist eine Spontanheilung nicht mehr möglich und es kommt zur Ausbildung einer Pseudarthrose [Calori 2011].

1.1.4 Osseointegration

Eine der Frakturheilung ähnliche Reaktion kann beobachtet werden, wenn autologes Knochengewebe, allogene, alloplastische oder xenogene Knochenersatzmaterialien oder enossale Implantate in den Knochen eingebracht oder diesem angelagert werden.

Die Erforschung der Knochenreaktion auf das Einbringen enossaler Implantate wurde mit dem Aufkommen der intraoralen Implantologie zu einem Forschungsschwerpunkt [Branemark 1983b, Branemark 2001, Gutwald 2010]. Dabei konnte die gesamte enossale Integration eines Implantates in drei Phasen unterteilt werden, die eng miteinander verbunden sind [Albrektsson 2001]:

1. Osteoinduktion als Teil der physiologischen Knochenheilung
2. Osteokonduktion, die eine kurzwirkende Gewebeantwort auf ein Implantat darstellt
3. Osseointegration, die den langen Halt eines Implantates ermöglicht

Osteoinduktion ist „ein Prozess, bei dem die Osteogenese induziert wird“ [Albrektsson 2001]. Aus dem verletzten Knochen, insbesondere aus Periost und Blut, werden nicht-kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt, die die Reparatur des Knochens aktivieren [Schenk 1998]. Dabei werden Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark chemotaktisch angelockt und ihre Differenzierung zu

den Zielzellen der Osteogenese, den Osteoblasten, über Osteoblastenvorläuferzellen initiiert. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass Zellen, sobald sie ausdifferenziert sind, die Migration einstellen [Davies 1998]. Eine besondere Rolle spielen bei der Osteoinduktion die Gruppe der bone morphogenetic proteins (Kap. 1.2.1). Wegen ihrer osteoinduzierenden Eigenschaften werden diese Wachstumsfaktoren als Antwort auf ein Trauma oder im Rahmen des Remodelling freigesetzt. Durch die osteoinduktive Potenz besitzen sie sogar die Fähigkeit eine ektope Knochenbildung, z.B. in einem Muskel, zu veranlassen [Albrektsson 2001, Kohara 2011, Warnke 2004].

Die Zellverteilung und das Knochenwachstum auf der Oberfläche eines Implantates werden durch den Begriff der Osteokonduktion beschrieben [Albrektsson 2001, Marx 1998]. Für eine Osteokonduktion ist eine erfolgreiche Osteoinduktion notwendig. Die Voraussetzung hierfür ist eine Blutanlagerung auf der Implantatoberfläche die durch den operativen Eingriff gewährleistet ist [Davies 1996]. Das darin enthaltene Fibrinogen wird zu Fibrin umwandelt, lagert sich der Implantatoberfläche an und die Zellwanderung zum Implantat hin wird ermöglicht [Davies 1998]. Dann folgt analog zur reparativen Phase der Frakturheilung das Einsprossen von Kapillaren in das umliegende Gewebe und das Einwandern von Osteoprogenitorzellen in und auf das Implantat [Masuda 1998]. Dabei wird die Neoangiogenese durch die Wachstumsfaktoren (WF) IGF-I und -II, TGF- β und PDGF unterstützt [Albrektsson 2001]. Es kommt zu einer Kontraktion des vorher gebildeten Fibringerinnsels, wodurch sich je nach Beschaffenheit der Implantatoberfläche, das Gerinnsel von dieser auch wieder ablösen kann [Davies 1998]. Im Rahmen der knöchernen Integration von Implantaten werden daher im Prinzip zwei Wege diskutiert, die als Distanz- und Kontaktosteogenese bezeichnet werden [Osborn 1980]. Bei der Distanzosteogenese differenzieren die Zellen vor dem Erreichen der Implantatoberfläche aus. Es findet somit keine Zellapposition an der Implantatoberfläche statt, sondern der Kontakt wird durch eine extrazelluläre Matrix hergestellt [Steflik 1998]. Bei diesem Vorgang kann eine geringere Stabilität des Implantates resultieren, wenn es zu einer Einlagerung von Zellen und extrazellulärer Bindegewebsmatrix kommt, die eine Verbindung zwischen Implantatoberfläche und Knochen in diesen Abschnitten nicht zulässt. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Kontaktosteogenese die Knochenformation direkt an der Oberfläche des Implantates. Dies wird möglich, wenn die Implantatoberfläche vor der Ausdifferenzierung der osteogenetischen Zellen erreicht wird [Davies 1998, Furlong 1991]. Sobald die Zellen zu Osteoblasten ausdifferenziert sind, beginnen sie Osteoid zu produzieren. Zunächst

werden Osteopontin und Sialoprotein sezerniert, dann heftet sich Kalziumphosphat an die Bindungsstellen dieser Proteine und bildet fächerförmige Kristalle [Davies 1998]. Anschließend werden Kollagenfasern sezerniert, welche an dieser Schicht binden und dort kalzifizieren und den initialen Geflechtknochen bilden. Der Knochen ist folglich durch eine Kittlinien-ähnliche schmale Schicht aus amorphem Gewebe vom Implantat getrennt. Diese erste kalzifizierte Schicht, welche kollagenfrei, jedoch reich an Kalzium, Phosphor, Osteopontin und Sialoprotein ist, weist eine Dicke von 20nm bis 5000nm auf [Albrektsson 2001, Boss 1999, Davies 1996]. Es sollte allerdings beachtet werden, dass der Erfolg der Osteokonduktion nicht nur von der Fähigkeit zur Knochenreparatur des Organismus, sondern auch von den Eigenschaften des Implantatmaterials abhängt [Albrektsson 2001].

Der letzte Prozess, die Osseointegration, setzt eine erfolgreiche Osteoinduktion und Osteokonduktion voraus. Er führt zu einer stabilen und langjährig anhaltenden Fixation des Implantates im Knochen [Albrektsson 2001]. Unabhängig davon muss die Osseointegration eines Implantates als eigenständiger, komplexer Prozess aufgefasst werden und nicht als das zwingende Ergebnis einer erfolgreichen Osteoinduktion und Osteokonduktion. Ziel ist eine möglichst umfangreiche Integration und ein Umwachsen des Implantates im Knochen, wobei eine hundertprozentige Knochenanlagerung an der Implantatoberfläche auch nach vielen Jahren nicht beobachtet werden konnte [Albrektsson 2001, Schenk 1998]. Der in der Osteokonduktionsphase gebildete Geflechtknochen wird während der Osseointegrationphase durch Remodelling in lamellären Knochen umgebaut und stabilisiert das Implantat [Schenk 1998]. Die Beständigkeit des Knochen-Implantat-Interface hängt maßgeblich von einer guten Knochenqualität mit ausreichender Vaskularisation [Chung 2006, Kim 2006] und von der Konfiguration und Beschaffenheit der Implantatoberfläche ab [Bateli 2011, Wennerberg 2010]. Weitere Faktoren für eine gelungene Osseointegration sind von verschiedenen Autoren benannt worden. So wird auf die Vermeidung eines großen Präparationstraumas und die Notwendigkeit einer sofortigen Stabilisierung des Implantats, respektive die Vermeidung einer Sofortbelastung im Rahmen der Frakturversorgung hingewiesen, um das Entstehen einer bindegewebigen Zwischenschicht zu vermeiden [Boss 1999, Branemark 1983a, Brunski 1999, Cameron 1973, Goldberg 1999, Gondolph-Zink 1998, Huja 1999, Linder 1989, Romanos 2010, Schenk 1998].

1.2 Wachstumsfaktoren

Im Jahr 1965 berichtete Urist dass Proteinextrakte aus Knochen eine Knorpel- und Knochenneubildung induzieren können und beschrieb erstmals die de novo Knochenformation durch heterotop implantierte, demineralisierte Knochenmatrix. [Urist 1965, Van de Putte 1965, Vandeputte 1965]. Es konnte eine Gruppe von osteoinduktiven Matrixproteinen isoliert werden welche unter dem Begriff der „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) zusammengefasst wurden und zur Gruppe der Wachstumsfaktoren gehören [Urist 1971].

In der Folge konnten weitere Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden die in der Lage sind, Knochenwachstum signifikant zu beschleunigen und stimulierend auf die Heilung des umliegenden Gewebes wirken [Lind 1998, Trippel 1996, Zellin 1997c]. Es handelt sich hierbei um Polypeptide von 6-45 kDa, die an der Zellproliferation, -differenzierung und Morphogenese von Gewebe und Organen während der Embryogenese, im Wachstum und im Erwachsenenalter beteiligt sind [Schliephake 2002]. Für verschiedene Wachstumsfaktoren konnte in zahlreichen Studien eine osteoinduktive Wirkung durch einen stimulierenden Effekt auf osteo- und chondrogene Zellen nachgewiesen werden [Aspenberg 1989, Isgaard 1986, Joyce 1990, Linkhart 1996, Nielsen 1994, Nilsson 1986, Nilsson 1987, Wildemann 2003, Yasko 1992]. Von besonderer Bedeutung sind bone morphogenetic protein (BMP), transforming growth factor (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF) und epidermal growth factor (EGF). [Kempen 2010].

Der Grad der Knochenneubildung und -resorption wird durch die Konzentration der im Knochen gespeicherten Wachstumsfaktoren beeinflusst [Linkhart 1996]. Die Faktorenkonzentration im Knochen hängt von der Lokalisation, den physiologischen Bedingungen und nicht zuletzt dem Alter ab. Im kortikalen Knochen nehmen die Konzentrationen von IGF-I und TGF- β mit zunehmendem Alter ab [Nicolas 1994].

Den bone morphogenetic proteins wird die größte osteoinduktive Potenz zugesprochen welche durch Kombination verschiedener BMPs verstärkt werden kann [Israel 1996, Niikura 2006, Ripamonti 2001, Zhu 2004]. Aber auch durch die Kombination der Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und IGF-I konnte ein synergistischer und damit verstärkter, stimulierender Effekt auf den Knochenstoffwechsel demonstriert werden [Deppe 2004b, Deppe 2003b].

1.2.1 Bone Morphogenetic Proteins

Bone morphogenetic proteins sind dimere Moleküle, welche aus großen Vorläufermolekülen synthetisiert werden [Reddi 1998a, 1998b, Wozney 1998] und gehören zur *TGF- β* Superfamilie [Rosen 1992, Thies 1992]. Das reife, biologisch aktive *BMP-2* ist ein Homodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten mit jeweils 114 Aminosäuren [Scheufler 1999]. BMPs werden in Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten gebildet und in der extrazellulären Knochenmatrix gespeichert [Barnes 1999]. Im Rahmen der Knochenheilung werden BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7 und -8 und ihre Rezeptoren exprimiert [Barnes 1999, Lissenberg-Thunnissen 2011, Yu 2010]).

Bis heute sind 20 verschiedene BMPs bekannt von denen mindestens 7 eine osteoinduktive Wirkung besitzen [Kempen 2010, Riley 1996]. Der Anteil an bone morphogenetic proteins wird auf lediglich 1 μ g pro Kilogramm Knochengewebe geschätzt [Kübler 1997] was die Verwendung von synthetisch hergestellten Proteinen notwendig macht. Diese tragen das Präfix *rh* für rekombinantes humanes bone morphogenetic protein (rhBMP) [Wang 1990].

Die Serum-Halbwertszeit von Wachstumsfaktoren beträgt wenige Minuten bis Stunden [Zapf 1986], ihre Regulation erfolgt auf mehreren molekularen Ebenen und durch proteasomale Degeneration [Chen 2004, Senta 2009]. Eine Verlängerung der Wirkdauer kann durch ein Trägersystem mit langsamer Freisetzungskinetik der BMP-Moleküle erreicht werden [Takahashi 2005]. So wurde in einem Kollagen-Schwamm mit rhBMP-2 eine anhaltende Freisetzung von aktivem Protein mit einer Halbwertszeit von 3 - 5 Tagen nachgewiesen [Winn 1999].

Die wesentlichen Wirkungen der bone morphogenetic proteins im Muskel- und Skelettsystem bestehen in der Gewebedifferenzierung im Rahmen der Embryonalentwicklung und der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondroblasten und Osteoblasten [Bostrom 1998, Chen 1998, Christiansen 2000, Reddi 1994]

Im Rahmen dieses Versuches wurde das rekombinante, kommerziell erhältliche *rhBMP-2* der Firma Induct Os[®] (Wyeth, Münster, Deutschland) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass *BMP-2* im Vergleich zu anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ein größeres Potenzial zur Förderung der Knochenheilung besitzt [Kandziora 2002c] und sich positiv auf die Frakturheilung auswirkt [Boden 1998, Garrison 2010, Govender 2002, Kubler 1998]. Dabei beruht die Wirkung von *rhBMP-2* sowohl auf der

Förderung der Differenzierung osteoblastärer Zellen als auch auf die Förderung der Reifung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix und nimmt damit Einfluss auf die frühen Phasen der Knochenheilung [Kandziora 2002b, Kandziora 2002c]

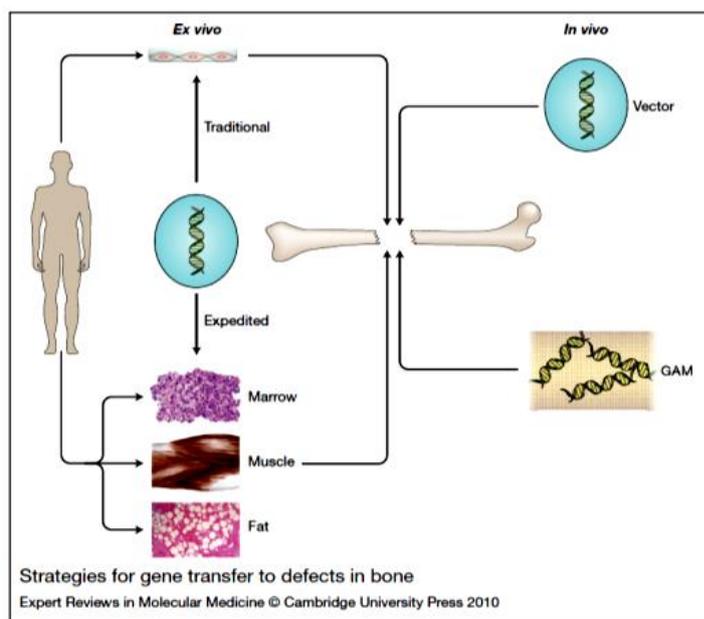
In Tierversuchsmodellen konnte durch die Applikation von rhBMP-2 eine beschleunigte Kallusbildung und -reifung erzielt werden [Kandziora 2002b, Murakami 2002, Zellin 1997a, 1997b]. Dabei wird die Erhöhung der Frakturstabilität über die Beschleunigung der Frakturheilung und nicht über eine vermehrte Kallusbildung erreicht [Bax 1999, Schmidmaier 2002]. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Knochenneubildung steht in direktem Zusammenhang mit der Menge des eingebrachten rhBMP-2 [Kübler 1997, Riley 1996].

BMP-2 und BMP-7 sind für den klinischen Einsatz freigegeben [Schmidmaier 2008]. Derzeitige Indikationen liegen bei der Versorgung von Pseudarthrosen, Wirbelkörperfrakturen und offenen Tibiafrakturen. Die Fähigkeit zur ektopen Knochenbildung und die hohen Kosten für rhBMP-2 machen ein zuverlässiges Trägersystem mit einer kontrollierten Freisetzungskinetik erforderlich [Bishop 2007, Zioncheck 1994]. Die Erforschung des optimalen Trägersystems [Schmidmaier 2008], der vielfältigen Therapiekombinationen von Wachstumsfaktoren [Kempen 2010] und die Kombinationen von Therapieverfahren [Calori 2011] stellen aktuelle Fragestellungen dar.

1.3 Gentransfer

Zwei Probleme stehen bei der direkten Applikation von Wachstumsfaktoren im Defektbereich im Vordergrund. Zum einen kann weder eine lokal überschießende Wirkung oder ein systemischer Nebeneffekt ausgeschlossen werden, zum anderen ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit eine große Menge des rekombinanten Proteins erforderlich, was diese Therapieform sehr kostenintensiv macht [Evans 2011, Kawai 2003]. Ein Lösungsansatz besteht in der Produktion der Wachstumsfaktoren am gewünschten Wirkort durch Genterapie [Hannallah 2003]. Hierzu wird die komplementäre DNA (cDNA) der Wachstumsfaktoren [Dillon 1993] in Zielzellen am Wirkungsort eingeschleust und der gewünschte Wachstumsfaktor im Defektbereich erzeugt [Carofino 2008]. Dieser Gentransfer stellt dabei die größte technische Herausforderung dar [Kay 2001].

Das ideale Gentransfersystem sollte biologisch vollständig abbaubar, nicht toxisch und in der Lage sein, die genetische Information in die Zielzellen zu inkorporieren, um dort eine effiziente Genexpression erreichen zu können. Gleichzeitig sollte keines seiner Komponenten eine Immunantwort hervorrufen. [Brisson 1999]. Ein diesen Anforderungen

**Abb. 1-2 Varianten des Gentransfers**

Es stehen zwei Varianten des Gentransfers zur Verfügung: Beim in-vivo Verfahren wird der Vektor entweder als freie Suspension oder gebunden an ein Trägermaterial (GMA: Gen-Aktivierte-Matrix) direkt am Wirkungsort appliziert; beim ex-vivo Verfahren werden im klassischen Verfahren (Traditional, links oben) Zellkulturen in vitro genetisch modifiziert und dann meist auf einem Trägermaterial eingebracht, im beschleunigten Verfahren (Expedited, links unten) wird körpereigenes Gewebe (v.o.n.u.: Knochenmark, Muskel oder Fett) intraoperativ genetisch modifiziert und direkt in den Defekt eingebracht. Auf eine zweite Operation, das Anlegen einer Zellkultur und die Verwendung eines Trägermaterials kann hierbei verzichtet werden. [Evans 2010, Kolk 2007]

am ehesten entsprechendes etabliertes Gentransfersystem sind Vektoren. Dabei handelt es sich um Konstrukte, welche das spezifische Reporter-Gen oder das therapeutische Gen in Form eines Plasmids enthalten und den Transfer dieser cDNA in die Zielzellen verbessern. Wird für diesen Vorgang ein viraler Vektor genutzt, verwendet man den Begriff der „Transduktion“, bei der Nutzung eines nicht-viralen Vektors spricht man von „Transfektion“. Der Vorteil der Plasmide besteht darin, dass sie nur transient in das Genom der Zelle integriert und damit nur für einen gewissen Zeitraum wirksam werden [Carofino 2008].

Ein erfolgreicher Gentransfer mit Genexpression führt zu einer kontinuierlichen und lokal begrenzten Synthese von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren. Dabei ist davon auszugehen, dass bei der körpereigenen Produktion von Wachstumsfaktoren eine echte posttranslationale Modifikation durchgeführt wird und im Gegensatz zur Verwendung von rekombinantem Protein eine immunogene Verunreinigung mit inaktiven, fehlgefalteten Proteinen ausbleibt. Zudem wird die Sicherheit bei der Verwendung von Wachstumsfaktoren erhöht, da die lokale Produktion der osteogenen Proteine in annähernd physiologischer Konzentration die Wahrscheinlichkeit einer systemischen Verbreitung mit ektopter Knochenbildung reduziert [Evans 2010]. Für die in vivo Implantation (Abb. 1-2) wird der Vektor meist in ein biokompatibles und ggf. resorbierbares Trägermaterial eingebracht. Zur Verfügung stehen natürliche Polymere (Kollagen, Hyaluronsäure, Fibrin), anorganische Materialien (Calciumphosphat, Bioglass) und synthetische Polymere (PDLLA) [Seeherman 2005]. Da BMP-2 zu einer Verbesserung der Knochenheilung um enossale Implantate führen kann [Junker 2009] ist die Applikation von Vektoren auf einer Titanoberfläche eine sinnvolle Erweiterung des therapeutischen Spektrums [Kolk 2007].

1.3.1 Viraler Gentransfer

Mit ihrer Fähigkeit, körperfremde Erbinformation in Zellen einzubringen stellen Viren ein sehr effizientes Transfersystem dar [Knoell 1998]. Zahlreiche *in vivo* Studien an Tieren mit viralem BMP-2 Gentransfer konnten zeigen, dass es zu einer Beschleunigung der Knochenregeneration bzw. einer ektopen Knochenbildung kommt [Alden 1999, Dragoo 2003, Luo 2011, Musgrave 1999, Varady 2002]. Hierzu werden virale Vektoren verwendet, denen die Fähigkeit zur Replikation genommen wurde [Tabin 1982, Wei 1981]. Der Vorteil des viralen Gentransfers (Abb. 1-3), mit Hilfe der hocheffizienten viralen Transduktionssysteme therapeutische Gene in den Zielzellen zu exprimieren, stellt sich hinsichtlich einer möglichen Mutagenese, oder durch unkontrollierten Einbau viraler oder therapeutischer DNA in das menschliche Genom, als Risiko dar [Cooke 2001, Kimmelman 2005, Mitani 2002]. So besteht die Gefahr, dass Viren die Fähigkeit zur Replikation wiedererlangen und zu Infektionen beim Patienten führen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass virale Gensequenzen in das Genom der Wirtszelle integriert und so unkontrolliert weitergegeben werden, unter Umständen sogar maligne Transformationen hervorrufen oder direkt zum Tode führen [Knoell 1998]. Darüber hinaus kann der Vektor selber wie auch das therapeutische Protein eine schwere Immunreaktion hervorrufen [Brown 2002, Kimmelman 2005, Simon 1993, Worgall 1997]. Bei etwa 1500 klinischen Genthherapie-Studien am Menschen seit der Erstbeschreibung der Genthherapie am Menschen [Rosenberg 1990] kam es zu zwei Genthherapie-assoziierten Todesfällen [Evans 2008, Raper 2003].

Die *ex vivo* Anwendung der viralen Transduktion, im Rahmen des *in vitro tissue engineering*s oder *intra operationem*, führt nicht zu einer Verringerung der Risiken einer viralen

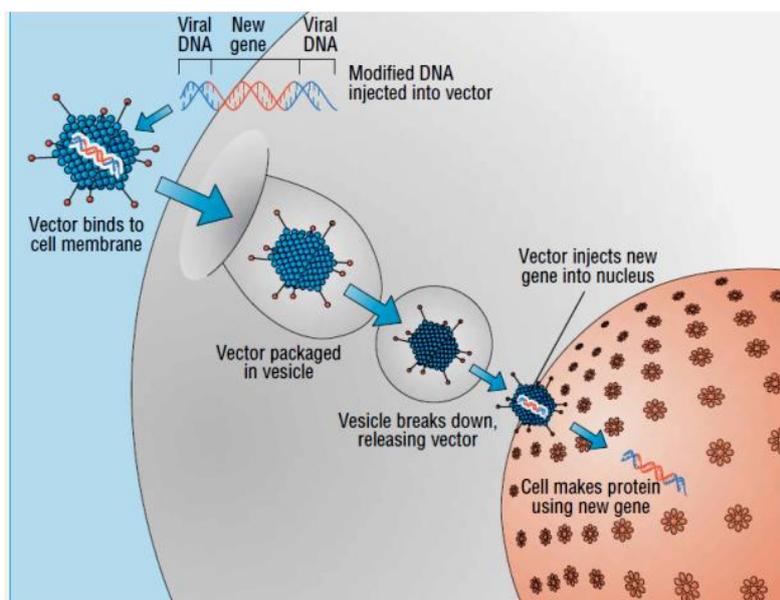


Abb. 1-3 Viraler Gentransfer

Die therapeutische DNA (New gene) wird integriert in die virale DNA (Viral DNA) im viralen Vektor bis den Zellkern (Nucleus) der Zielzelle transportiert. Dort erfolgt die Synthese des therapeutischen Proteins. Der Vektor kann dabei *in-vivo* oder *ex-vivo* eingebracht werden (Abb. 1-2). [Kimmelman 2005]

Gentherapie. Die trotzdem notwendige Implantation der transduzierten Zellen an den Wirkort beinhaltet die gleichen Risiken wie der direkte in-vivo Gentransfer [Dragoo 2003]. Letztlich ist auch zu beachten, dass trotz der deutlich geringen Kosten, im Vergleich zur Verwendung des rekombinanten Proteins die viralen Vektoren in einem aufwändigen und kostenintensiven biologischen Verfahren hergestellt werden müssen [Kawai 2003]. Eine Alternative stellt der nicht-virale Gentransfer dar bei dem keine originären Komponenten eines viralen Vektors oder der viralen DNA inkorporiert werden.

1.3.2 Nicht-viraler Gentransfer

Für den Einsatz am Menschen bietet der nicht-virale Gentransfer deutliche Vorteile hinsichtlich möglicher unerwünschter Nebenwirkungen. Die nicht-viralen Gentransfersysteme besitzen nur geringe oder gar keine Immunogenität. Im Gegensatz zu viralen Vektoren werden die Plasmide nicht stabil ins Genom der Zelle integriert, sondern verbleiben episomal im Zytoplasma [Ledley 1995]. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil ist außerdem, dass sie im Vergleich zu viralen Vektoren einfacher und preiswerter herzustellen sind [Gao 2007]. Ein Nachteil aller nicht-viralen Gentransfersysteme besteht darin, dass sie eine vergleichsweise geringe Transfektionseffizienz mit kurz dauernder Genexpression aufweisen [Hannallah 2002, Stiehler 2006]

Zu den nicht-viralen Gentransfersystemen gehören der direkte Transfer von Plasmid-DNA („naked DNA“), die Applikation von eingekapselter Plasmid-DNA, die Mikroinjektion von künstlichen Chromosomen [Co 2000] und die Verwendung von selbstaggregierenden Komplexen (Abb. 1-4) [Eliyahu 2005].

Die einfachste Form des nicht-viralen Gentransfers stellt dabei der direkte DNA-Transfer von Plasmid-DNA dar. Dies kann entweder durch intravenöse Injektion, Mikroinjektion, Electroporation, Ultraschall oder Einschließen von DNA beschichteten Metallpartikeln („gene gun“) durchgeführt werden [Mehier-Humbert 2005a, Mehier-Humbert 2005b]. Nachteilig ist die geringe Genexpression aufgrund des raschen Abbaus durch Serumnukleasen [Godbey 2000]. Bei intravenöser Injektion beträgt die Halbwertszeit beispielsweise weniger als 10 Minuten [Kawabata 1995]. Am erfolgreichsten und häufigsten werden, wie auch in dem hier beschriebenen Versuchsansatz, selbstaggregierende Komplexe in Form kationischer Liposome und kationischer Polymere eingesetzt.

1.3.2.1 Selbstaggregierende Komplexe

Selbstaggregierende Komplexe bestehen aus Nukleinsäuren und synthetischen Trägersubstanzen [Luo 2000]. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlich geladenen Komponenten führen zur Bildung von Komplexen bei denen zwei Gruppen unterschieden werden: Die liposomal basierten „Lipoplexe“ haben einen Durchmesser von 200-2000nm [Eliyahu 2005] während die in diesem Versuch verwendeten Trägersubstanzen auf Polymerbasis einen „Polyplex“ mit einen Durchmesser von 60-110nm bildeten [Honig 2010]. Polyethylenimin (PEI) hat sich in den letzten Jahren wegen seiner hohen Transfektionsrate als eine der effizientesten Trägersubstanzen für Nukleinsäuren etabliert [Boussif 1995]. Das PEI-DNA-Polyplex bindet nach Kondensation unspezifisch an negativ geladene Proteoglykane der Zelloberfläche [Kopatz 2004, Mislick 1996] in die es durch Endozytose aufgenommen wird [Tang 1997]. Im Endosom erfolgt die Freisetzung der nicht-viralen Genvektoren, welche zur Aufnahme in das Zytoplasma führt [Akinc 2005]. Die finale Barriere stellt die Zellkernmembran dar. Während der Mitose kommt es zu einer partiellen Auflösung der Membran durch die die Plasmid-DNA hindurchtreten kann [Brunner 2000]. In der Interphase hingegen muss der aktive Transport durch den Kernporenkomplex erfolgen. Nach dem Einschleusen der Plasmid-DNA in den Zellkern kommt es zur Transkription und die Synthese der Wachstumshormone kann eingeleitet werden [Eliyahu 2005, Lam 2010].

In vitro und in vivo zeigten die non-viralen Transportsysteme oftmals nur eine geringe Transfektionseffizienz und teilweise zytotoxische Effekte [Dincer 2005].

Die Verringerung der Zytotoxizität konnte durch die Entwicklung von copolymer protected gene vectors („COPROGs“), erreicht werden (Abb. 1-4). Dabei wird in einem zweiten Schritt der Autoaggregation das außen positiv geladene PEI-DNA-Polyplex von einem Hüllpolymer, dem protective copolymer (PROCOP) umgeben. Durch den Einsatz

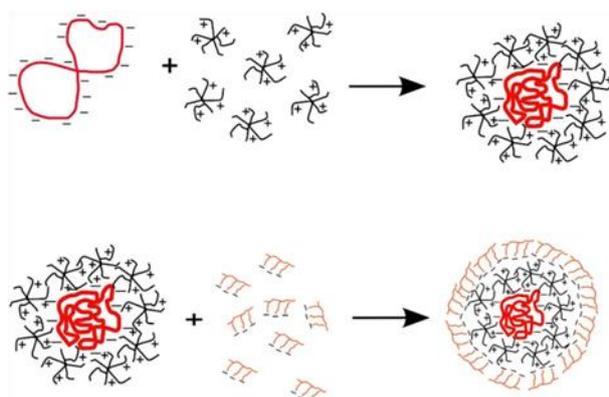


Abb. 1-4 Aufbau COPROGS

Schematische Darstellung der Autoaggregation eines Copolymer geschützten Genvektors (**copolymer protected gene-vectors**) Negative geladene Plasmid DNA (rot) wird von Polyethyleniminsequenzen (schwarz) umgeben. Es bildet sich ein PEI-DNA-Polyplex.

In einem zweiten Schritt wird dieser außen positiv geladene Polyplex von negativ geladenen Copolymeren (rosa) umlagert. [Honig 2010]

des PROCOP wird der Polypex zusätzlich weitgehend vor Interaktionen mit Serumproteinen und vor Opsonierung geschützt, was zu einer Verlängerung der Halbwertszeit führt [Finsinger 2000, Godbey 2000, Honig 2010].

1.3.2.2 PDLLA als biodegradierbare Beschichtung

Für die klinische Anwendung der COPROGs ist die Applikation auf einem Trägermaterial notwendig. In *in vitro* und *in vivo* Studien erwiesen sich unter anderem Kollagenschwämme [Scherer 2002], Poly (D,L-Laktid) [Kolk 2007] und Fibrinkleber [Schillinger 2008b] als geeignet.

Für die stabile Beschichtung metallischer Implantatoberflächen kam das biodegradierbare und biokompatible Poly (D,L-Laktid) Resomer® R203® (Boehringer®-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) zur Anwendung. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aufnahme von COPROGs als auch eine Freisetzung der Plasmid-DNA mit Transfektion der Zielzellen erfolgt [Kolk 2007]. Dabei konnte ein Verbund zwischen Implantatoberfläche und dem PDLLA erzielt werden, bei dem sich bei der Insertion dentaler Implantate das Trägermaterial nicht mechanisch von der Titanoberfläche löst, sondern die COPROGs ihre osteogene Wirkung direkt am Knochen-Implantat-Interface entfalten können [Kandziora 2002a, Schmidmaier 2006, Schmidmaier 2001a, Wildemann 2004]. In der vorliegenden Studie wurde das in einen nicht-viralen Genvektor (COPROG) integrierte BMP-2-Plasmid mit PDLLA als Trägermaterial *ex vivo* und *in vivo* auf einer Titanbasis eingesetzt [Kolk 2011].

1.4 Polychrome Sequenzmarkierung

1.4.1 Technik der polychromen Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein dynamisches Verfahren zur Beurteilung von Knochenwachstum im zeitlichen Verlauf. Dazu ist die Gabe fluoreszierender Substanzen, sogenannter Fluorochrome, notwendig die einen Chelat-Komplex mit dem freien Kalzium im Bereich des sich neu bildenden Knochens eingehen. Werden die Substanzen zu definierten Zeitpunkten appliziert, ist eine zeitliche Zuordnung des neu gebildeten Knochens zu einem Zeitintervall möglich [Rahn 1976].

Die grundlegenden Arbeiten zur Fluoreszenz des Knochens und der intravitalem Knochenmarkierung wurden bereits Mitte des zwanzigsten Jahrhundert durchgeführt und dienten in erster Linie der monochromatischen Darstellung von Knochenwachstum und Frakturheilung. [Armstrong 1966, Bachman 1965, Frost 1968, 1969, Harris 1960, Hattner

1962, Prentice 1965]. Die bis dato einzige, für die Anwendung am Menschen zugelassene, Fluorochromklasse stellt die Gruppe der Tetracycline dar. Dies erlaubte eine umfassende Erforschung multipler Knochenerkrankungen wie Osteopetrose, Osteoporose, Osteomalazie oder Osteogenesis imperfecta [Frost 1969, 1992]. Die Weiterentwicklung der Technik zu einer polychromatischen Darstellung, durch die sich der zeitliche Ablauf, die Knochenwachstumsrichtung und eine qualitative und quantitative Analyse des Knochenwachstums durchführen ließen, wurde umfassend von Rahn beschrieben. Diese Untersuchungen enthielten auch die Beurteilung der bekannten Fluorochrome hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, Toxizität und Kombinierbarkeit [Rahn 1976].

Eine weite Verbreitung erlebte die Technik mit der Entwicklung des tissue engineering [Reddi 1991], der Entdeckung der osteoinduktiven Wachstumsfaktoren [Urist 1965] und der Erforschung der Osseointegration [Branemark 1983a]. Mit Hilfe der konventionellen Knochenhistologie konnte man die chronologische Abfolge der beobachteten Veränderungen im Wachstumsmuster nur ungenügend darstellen. Die Färbung nach Levai-Laczko erlaubte lediglich die Differenzierung zwischen neu gebildetem und ortständigem Knochen [Laczko 1975]. Zudem war die Explantation des Gewebes notwendig was unweigerlich zum Ende des Versuchs führte. Dabei waren gerade diese Untersuchungen auf eine hohe zeitliche Aufschlüsselung der Knochenumbauvorgänge angewiesen. Mit nicht-invasiven bildgebenden Verfahren wie der konventionellen Röntgenuntersuchung, nuklearmedizinischen Darstellungen oder durch Biolumineszenz kann keine detaillierte Darstellung des Knochengewebes auf mikroskopischer Ebene angefertigt werden [Baschong 2001a, Baschong 2001b, van Gaalen 2010]. Diese Lücke konnte durch die polychrome Sequenzmarkierung geschlossen werden.

Die Applikation der Fluorochrome kann oral oder parenteral erfolgen. Bei der parenteralen Verabreichung bei Kleintieren ist die subkutane Gabe, bei größeren Tieren die intravenöse Gabe der intramuskulären Applikation vorzuziehen. Der Abstand zwischen zwei Färbungen sollte bei kleinen Tieren 5-10 Tage betragen, wobei die letzte Fluorochromgabe 1-2 Tage vor Opferung erfolgen sollte [van Gaalen 2010].

Um eine möglichst hohe räumliche und zeitliche Auflösung zu erhalten war es notwendig die intravitale Färbung zu optimieren [Pilolli 2008]. Bis zu sieben verschiedene Fluorochrome können mittels Spektraler Bildanalyse dargestellt werden, während mit konventioneller Auflichtfluoreszenzmikroskopie eine Differenzierung von bis zu vier Fluorochromen möglich ist [Pautke 2005].

Je höher die Anzahl der verwendeten Fluorochrome desto schwieriger ist die Auswertung, da die einzelnen Farben nicht sicher getrennt werden können. Eine eindeutige Darstellung gelingt oft nur im Bereich des Lamellenknochens bei dem die Knochenapposition bandenförmig verläuft. Während der Kallus- und Geflechtknochenbildung im Rahmen der initialen Knochenheilung sind diese Wachstumsbanden nicht vorhanden.

Ein Standard zur polychromen Sequenzmarkierung konnte bis heute nicht etabliert werden. Die Auswertung der Proben erfolgt in erster Linie mittels konventioneller Auflichtfluoreszenzmikroskopie oder konfokaler Laser Scanning Mikroskopie [van Gaalen 2010].

1.4.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Das Prinzip der Konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1955 entwickelt um die Auflösung die durch konventionelle Mikroskope erreicht werden konnte zu verbessern [Minsky 1988]. Erst durch die Einbindung von leistungsfähigen Computern zur Datenerhebung, -speicherung und -auswertung konnte sich die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie in ihrer heutigen Form etablieren [Jones 2005].

Das Fluorochrom in der Probe wird mittels eines Lasers definierter Wellenlänge angeregt (Abb. 1-5). Der Strahlenexpander erhöht den Durchmesser des Laserstrahls, um die Größe des Objektivs auszunutzen. Der Ortsfilter dient dabei der Rauschunterdrückung. Das Objektiv fokussiert den Strahlengang auf die Probe. Das emittierte Licht wird dann über einen Strahlenteiler, der nur für Licht mit Wellenlängen über- oder unterhalb definierter Parameter durchgängig ist, in Richtung des Photodetektors geleitet. Bevor das Licht auf den Photodetektor trifft muss es eine Lochblende (das sogenannte Pinhole) passieren die ober- und unterhalb der Fokusebene liegendes Licht eliminiert. Durch ein rasterförmiges Abtasten der Probe wird auf diese Weise im Computer ein Gesamtbild

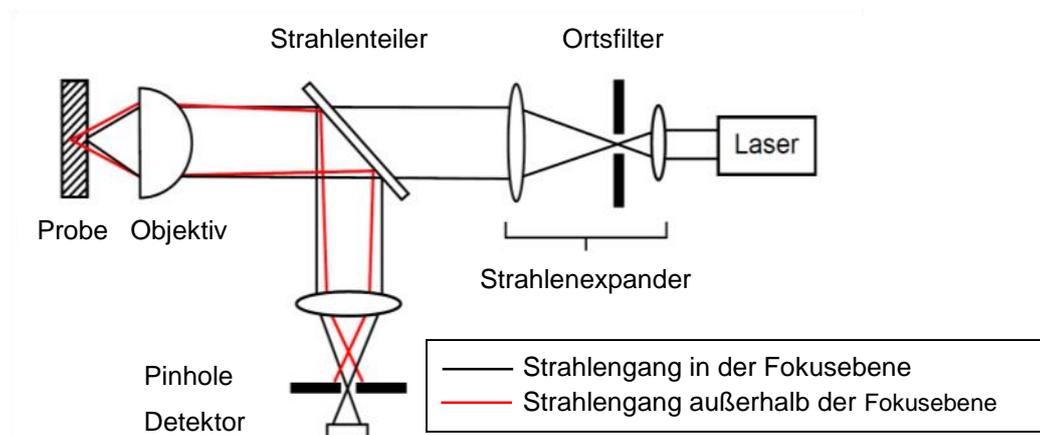


Abb. 1-5 Schematische Darstellung eines Konfokalen Mikroskops
Modifizierte Darstellung [Jones 2005]

errechnet. Auch eine dreidimensionale Darstellung der Probe ist möglich, wenn die Fokusebene in die Tiefe des Präparates gelegt wird [Jones 2005].

Im Gegensatz zu einem konventionellen Mikroskop wird die Abbildungsqualität in einem CLSM nicht ausschließlich durch die Optik beeinflusst, sondern z.B. auch durch die konfokale Blende (Pinhole) und die Digitalisierung der Objektinformation (Pixelgröße). Das Rauschen des Lichts (Laserrauschen bzw. Schrotrauschen des Fluoreszenzlichts) hat ebenso Einfluss auf die Qualität der Aufnahmen.

In der Knochenforschung wurde die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie 1985 eingeführt [Boyde 1985]. Detaillierte histomorphometrische Darstellungen des Aufbaus der Spongiosa [Smith 2006], des Knochenimplantatinterfaces [Piattelli 1994], der Osseointegration von Knochenersatzmaterial [Gorustovich 2007] und der Knochenstruktur der Kieferknochen [Pilolli 2008] wurden angefertigt.

Einen hohen Stellenwert hat die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie in der Darstellung zellulärer und subzellulärer Strukturen bei der durch Immunofluoreszenz die Lokalisation und Verteilung von Proteinen in Zellen in hoher Auflösung möglich ist. Dabei können die Strukturen der knochen- und knorpelbildenden Zellen [Jones 2005] wie auch aller anderen Gewebe in höchster Auflösung dargestellt werden [Tovey 2005].

2 Problem, Fragestellung und Ziel der Arbeit

2.1 Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, welche Möglichkeiten und Vorteile die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie in der Auswertung einer polychromen Sequenzmarkierung besitzt.

Die konventionelle Auflichtfluoreszenzmikroskopie gerät bei der Beurteilung einer polychromen Sequenzmarkierung des Geflechtknochens schnell an ihre Grenzen. Während die Differenzierung von bis zu vier Fluorochromen im Lamellenknochen wegen des klar abgegrenzten bandenförmigen Knochenwachstums gut möglich ist, sind die verwobenen Kalzifizierungen des Geflechtknochens in der Reparationsphase nicht beurteilbar. Die Ursache hierfür sind Überlagerungen der Fluorochrome. Während beim Auflichtfluoreszenzmikroskop das Licht röhrenförmig in das Präparat eindringt und alle Fluorochrome anregt kann durch das CLSM eine schmale, scheibenförmige Schicht überlagerungsfrei abgebildet werden (Abb. 2-1). Eine Anwendung auf die polychrome Sequenzmarkierung des Knochenwachstums mit mehr als zwei Fluorochromen, sowie unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren ist bis dato nicht beschrieben.

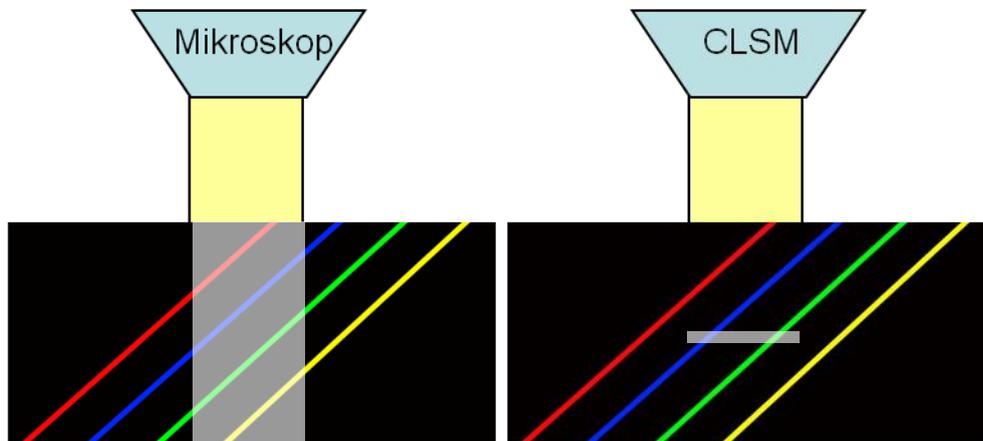


Abb. 2-1 Problem der Überlagerung

Vergleichende Darstellung der Exzitationsregion eines Auflichtfluoreszenz-mikroskops und eines CLSM im markierten Knochen (schwarz)

Neben der klaren Differenzierung liegt die zweite Herausforderung in der Darstellung einer möglichst großen Anzahl verschiedener Fluorochrome in einer einzigen Messung. Hierfür müssen nicht nur Exzitations- und Emissionsspektren der Fluorochrome bekannt sein, sondern erst die Kombination aus Fluorochrom, verwendeten Laserlinien und Filtern ermöglicht eine detaillierte Darstellung. Je mehr Fluorochrome zur polychromen Sequenzmarkierung zur Verfügung stehen, desto höher ist die zeitliche Auflösung der Knochenwachstumsvorgänge.

2.2 Zeitlicher Ablauf der Knochenheilung unter Einfluss von rhBMP-2 aus non-viralem Gentransfer

In der vorliegenden Arbeit soll neben der Verfahrensetablierung weiterhin gezeigt werden, welchen Einfluss BMP-2-Plasmid aus non-viralem Gentransfer im Vergleich zu direkt appliziertem rhBMP-2 auf den Zeitpunkt der Knochenwachstumsaktivität eines critical-size-defects am Rattenunterkiefer hat.

Die Osteoinduktion stellt eine Bedingung für die Frakturheilung und die erfolgreiche Osseointegration von Implantaten dar. Insbesondere für dentale Implantate mit ihrem weiten Indikationsspektrum in der präprothetischen Chirurgie ist ein stabiles Knochen-Implantat-Interface essentiell. Zum einen werden über diese Schnittstelle die Kaukräfte verteilt, zum anderen bildet der Knochen in Kombination mit den Weichgeweben eine Schutzbarriere gegen das Eindringen von Keimen der Mundhöhle. Ein dichtes Interface erhöht den Schutz der periimplantären Gewebe vor einer Periimplantitis, die konsekutiv zum Verlust des Implantates führen kann.

Aufgrund der demographischen Entwicklung ist davon auszugehen, dass die Zahl der Patienten mit onkologischen Vorerkrankungen, chronisch entzündlichen und degenerativen Knochenerkrankungen oder einer kompromittierten Knochenheilung Frakturen erleiden oder eine implantatgetragene prothetische Versorgung indiziert ist. Insbesondere damit auch bei fortgeschrittener Zahnlosigkeit keine weitere Minderung der Lebensqualität eintritt. Hierzu ist aktuell oft eine Optimierung des Knochenlagers durch Transfer von autologem Knochen notwendig. Durch Verwendung des Wachstumsfaktor BMP-2 wäre es möglich die Prognose sowohl des Knochentransfers, also auch der Osseointegration der Implantate im ersatzschwachen Knochenlager zu verbessern. Um die Risiken und Kosten einer derartigen Therapie zu minimieren, soll die Anwendung von BMP-2 aus non-viralem-Gentransfer überprüft werden.

Zur Anwendung kam ein etabliertes Knochendefektmodell im Kieferwinkel der Ratte, wobei unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse von BMP-2-Plasmid angewendet wurden, um die effektivste Dosis für einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration zu ermitteln. Zielgrößen waren die Knochenwachstumsaktivität im Defektbereich als Ausdruck der Knochenwachstumsaktivität, die mittels polychromer Sequenzmarkierung im zeitlichen Verlauf dargestellt wurde. Des Weiteren soll diese tierexperimentelle Studie zeigen, ob ein Implantat als Träger für eine gentransferierende Beschichtung zur Förderung der Knochenregeneration langfristig als Behandlungsalternative am Menschen geeignet ist.

3 Material und Methode

3.1 Polychrome Sequenzmarkierung und CLSM

3.1.1 Fluorochrome

Von den bekannten Fluorochromen wurden sechs gewählt, bei denen die subkutane Gabe bei Tierversuchen etabliert ist (Tab. 3-1).

Fluorochrom	Handelsnummer	Dosierung [mg/kg]	Excit [nm]	Em [nm]
Calzeinblau	M1255	30	373	420-440
Xylenolorange	227854	90	440/570	610
Calzeingrün	C0875	15	494	517
Alizarinkomplexon	A3882	30	530-580	624-645
Rolitetracycline	R2253	25	390-425	520-560
BAPTA	A4926	75	200-325	410-550

Tab. 3-1 Fluorochrome

Subkutan applizierte Fluorochrome mit Dosierungen und dem jeweiligen Exzitations- (Excit) und Emissionsmaxima (Em) [Pautke 2005]

Zur Vorbereitung einer Auswertung mittels CLSM war es notwendig nicht nur die Exzitations- und Emissionsmaxima der Fluorochrome zu kennen, sondern auch den individuellen Verlauf der Exzitations- und Emissionskurven zu bestimmen. Die Fluorochrome wurden zunächst auf ein halbes Kilogramm Körpergewicht dosiert, in 1ml aqua dest. in Lösung gebracht und auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Um den möglichen Einfluss einer Autofluoreszenz des Rattenknochens auszuschließen wurden sie mit frisch entnommenem und fein gemahlenem Rattenknochen von Sprague-Dawley-Ratten vermischt. Die Zerkleinerung des Rattenknochens ist notwendig, da sich die Fluoreszenzeigenschaften der Fluorochrome erst durch die Chelatkomplexbildung mit freiem Kalzium ausbilden. Hierfür kam eine Schwingmühle für Hart- und Weichgewebe zur Anwendung die uns vom Centrum Muskulo Skelettale Chirurgie der Klinik für Orthopädie am Campus Charité-Mitte und der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Campus Virchow-Klinikum (Berlin) zur Verfügung gestellt wurde. Eine visuelle Kontrolle des Erfolgs der Fluoreszenzmarkierung wurde mit einem konventionellem Auflichtfluoreszenzmikroskop Axioskop 2 (Zeiss, Deutschland) und einer UV-Halogenlampe HBO 100 (Zeiss, Deutschland) unter Verwendung des Filtersatzes 01 (Zeiss, Deutschland) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Emissions- und Exzitationseigenschaften wurde das Fluoreszenzspektrometer Fluorolog® (Horiba Jobin Yvon, Japan) und die Software Datamax (Horiba Jobin Yvon, Japan) verwendet, welche uns vom Institut für Physik der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt wurden. Die Darstellung der Emissions- und Exzitationsspektren wurde mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmont, USA) durchgeführt.

3.1.2 Polychrome Sequenzmarkierung

Mit den aus dieser Untersuchung gewonnenen Daten konnten nun im Rahmen von Vorversuchen eine sechsfach polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt werden. Dazu wurde den Tieren im Abstand von einer Woche Calzeinblau, Xylenolorange, Calzeingrün, Alizarinkomplexon, Rolitetetracyclin und BAPTA verabreicht.

Die Farbstoffe wurden als 3%ige Lösungen in 2%iger NaHCl₃ durch einen Einmal-Filter (0,45µm, Schleicher&Schuell GmbH, Dassel, Germany) in das subkutane Gewebe des Rückens injiziert. Den Injektionslösungen wurde jeweils Lidocain als Lokalanästhetikum beigemischt.

3.1.3 Herstellung der histologischen Präparate

Es wurde das Einbettverfahren mit Methylmethacrylat (MMA) nach einem standardisierten Protokoll der Anatomischen Anstalt der LMU München (Prof. Dr. Milz) verwendet (Tab. 3-2).

Tag	Medien
1-2.	100% Methanol.
3.	70% Ethanol, abends 80%Ethanol
4.	90% Ethanol
5+6.	100% Ethanol
7/-8.	Aceton (reinst)
9-12.	Einlegen in MMA (Vakuum)
12-15.	Wechsel des MMA (Vakuum)
15-22.	Einbettgemisch (Vakuum)
22.	Erneuerung des Einbettgemisches (Vakuum) Wasserbad
ab 23./24.	Polymerisation im Wärmeschrank
25.	Aushärten im Brutschrank (37 Grad)
ab 27.	Anfertigung der Schliifpräparate

Tab. 3-2 MMA-Einbettverfahren der Anatomischen Anstalt München

Die denudierten Knochenproben wurden zunächst in 100% Methanol bei 4 Grad fixiert, dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in ein Gemisch aus 100ml MMA, 25ml Plastoid und 3,5g Benzoylperoxid eingebettet. Die polymerisierten MMA-Blöcke wurden dann mit einer Standstichsäge in Zylinderform zugeschnitten. Hierbei war im



Abb. 3-1 Innenlochsäge

Rahmen des Hauptversuchs besonders auf die sorgfältige Ausrichtung der Präparate im MMA-Block zu achten, um später die Schnitt in der gewünschten Schichtung anfertigen zu können. Danach wurden die Zylinder mit Cyanolit-Kleber auf die für die Leica® SP 1600 Innenlochsäge (Abb. 3-1) bestimmten Messingblöcke geklebt. Mit Hilfe eines speziellen Mikrotoms wurden nach Aushärtung der Einbettmasse $100\pm 10\mu\text{m}$ dicke koronare Schnitte der unentkalkten Knochen gemäß der Sägeschlifftechnik nach Donath und Breuner [Donath 1982]

angefertigt. Der 5 mm durchmessende critical-size-defect am Kieferwinkel konnte so in 13 – 14 Schnitte vollständig durchgeschichtet werden (Abb. 3-2). Für die polychrome Sequenzmarkierung wurden mit einer Präzisionsmikroschleifmaschine (Fa. Exact, Nordestedt, Deutschland) $80\mu\text{m}$ starke Schriffe angefertigt. Die Eindeckelung erfolgte mit VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA).

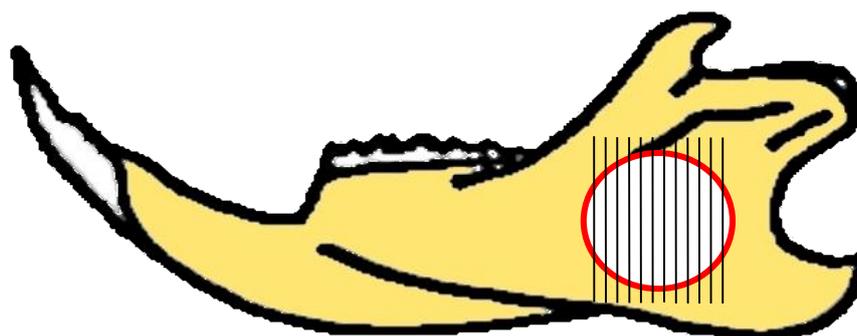


Abb. 3-2 Orientierung der Präparate

Koronare Ausrichtung der Präparate zum critical-size-defect (rot) am Rattenunterkiefer (gelb)

3.1.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Für die Erstellung des gesamten Fluoreszenzbildmaterials konnte ein LSM 510 META NLO (Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) am Light Mikroskopie Centre der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich, Schweiz, genutzt werden. Für die Bildakquise stand die digitale Mikroskopkamera AxioCam (Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) zur Verfügung. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der AIM 4.2 Bildanalyse Software (Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland).

Bei diesem Gerät handelt es sich um ein konfokales Laser Scanning Mikroskop mit einem Metadetektor und einer nicht linearen Optik (NLO). Durch den Metadetektor



Abb. 3-3 LSM 510 META NLO [Gábor 2011]

können die verschiedenen Fluorochrome in bis zu 6 getrennten Kanälen detektiert werden. Bei der nicht linearen Optik handelt es sich um den Chamelon-Multiphotonen-Laser (Coherent Inc., Santa Clara, USA), mit dem individuelle Exzitationslaserlinien eingestellt werden können.

Um eine Trennung der Fluorochrome bei weit

überlappenden Emissionsspektren zu erzielen, steht bei diesem System das sogenannte Emission Fingerprinting zur Verfügung, bei dem es sich um eine Weiterentwicklung im Rahmen der Metadetektion handelt. Zunächst wird die Emission über einen wählbaren Lichtwellenbereich in 10nm Schritten gemessen. Der Bildstapel der auf diese Weise generiert wird, wird als Lambda Stack bezeichnet. Für jeden Pixel des Lambda Stacks kann nun das Emissionsspektrum bestimmt werden. Das System verfügt über eine Emissionsspektren-Referenzdatenbank, die mit den gemessenen Kurven abgeglichen werden kann. Die in diesem Versuch verwendeten Fluorochrome sind in dieser Datenbank nicht enthalten, vermutlich, weil der Fokus dieser Technik auf der Immunofluoreszenz liegt. Alternativ können verschiedenen Emissionsspektren über eine automatische Automatic Component Extraction (ACE) ermittelt werden. Diese Spektren wurden dann, mit den in den Vorversuchen durch das Fluoreszenzspektrometer ermittelten Spektren abgeglichen und den Fluorochromen zugeordnet. Sind die Emissionskurven den Fluorochromen zugewiesen, können diese aus dem Lambda-Stack extrahiert werden. Dieser Schritt wird als Linear Unmixing bezeichnet (Abb. 4-5).

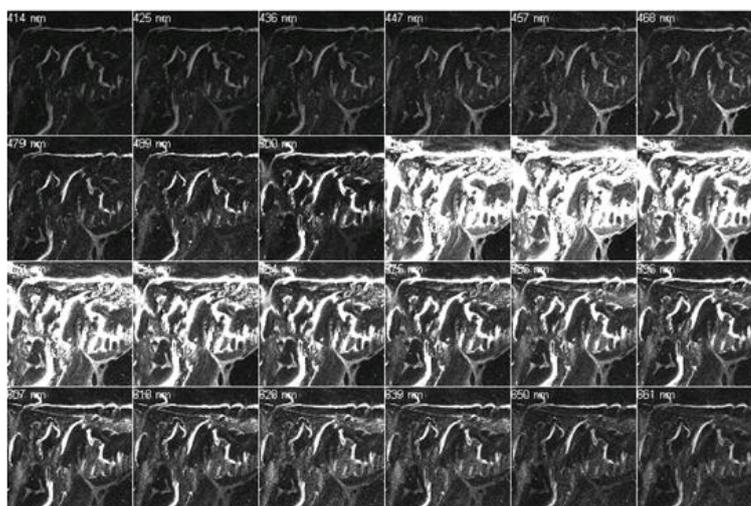


Abb. 3-4 Lambda Stack von 410-660nm

<u>Mikroskop</u>	Zeiss Axiovert 200M
<u>Laser</u>	Argon: 458, 477, 488, 514 nm HeNe: 543, 633 nm Chameleon MP laser: 705-980 nm
<u>Filter</u>	Filter Set 01 (DAPI) Filter Set 10 (FITC) Filter Set 20 (Rhodamine)
<u>Objektive</u>	10x 0.3NA Ph1 Plan-Neofluar 20x 0.8NA Plan-Neofluar 40x 1.3NA Öl DIC Plan-Neofluar 63x 1.4NA Öl DIC Plan-Apochromat 40x 1.2NA Wasser C-Apochromat corr.
<u>Detektoren</u>	2 Fluoreszenz PMTs 1 Transmissions PMT 1 Metadetektor
<u>Software</u>	AIM 4.2

Tab. 3-3 Spezifikation des LSM 510 META NLO des LMC der ETH Zürich
[Gábor 2011]

3.2 Tierversuch

Um die osteoinduktive Wirkung der BMP-2-Plasmide auf den beschriebenen, mit biodegradierbaren Trägermaterialien beschichteten Titanimplantaten darzustellen, wurde in dieser Arbeit ein orthotopes, tierexperimentelles Implantationsmodell am Kieferwinkel des Rattenunterkiefers gewählt (Abb. 3-2). Grundlage des Modells ist ein knöcherner Defekt kritischer Größe (critical-size-defect) [Hedner 1995, Schmitz 1986]. Dabei handelt es sich um den kleinstmöglichen Defekt der bei einer Tierart an einer definierten Stelle gesetzt werden kann, ohne dass ein spontaner Heilungsprozess stattfinden kann. Dadurch können Maßnahmen die eine Wirkung auf die Knochenneubildung bzw. Knochenregeneration im Defektbereich haben objektiv beurteilt werden. Zu beachten ist, dass neben den exogenen Maßnahmen auch die umgebenden Weichteile, die biomechanische Belastung, die vorliegenden ossären Strukturen (Knoche, Knochenmark, Periost) und auch das Vorliegen osteogener Zellen und Vorläuferzellen einen Einfluss auf die Knochenheilung haben.

3.2.1 Aufbau und Einteilung

Für den Tierversuch standen insgesamt 82 Tiere zur Verfügung, die in 6 Gruppen aufgeteilt wurden. Alle Tiere durchliefen die prä- und perioperative Phase in gleicher Art und Weise. Das postoperative Überleben war innerhalb der Gruppen variabel, da für weitere umfangreiche Untersuchungen unterschiedliche Überlebenszeitpunkte benötigt wurden. Für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen war lediglich der Zeitraum bis zum 28 Tag relevant, so dass das postoperative Überleben jenseits dieser Marke keinen Einfluss hat.

Es wurden Titanimplantate mit in PDLLA resuspendierten COPROGs mit BMP-2-Plasmid in den Konzentrationen 2,5µg, 12,5µg, 25µg, 50µg und 100µg beschichtet. Dem gegenüber stand die Gruppe, in der die mit PDLLA beschichtete Titanfolie mit rhBMP-2 Protein in einer Konzentration von 62,5µg versetzt wurde. Eine ausführliche Untersuchung des komplexen Träger- und Freisetzungssystems und der Nachweis der Transfektion von Zielzellen und der Expression von BMP-2 wurde im Vorwege diese Untersuchung erbracht (Abb. 3-5) [Kolk 2007].

Gruppe	Dosierung	Anzahl
rhBMP-2	62,5 mg	17
BMP-Plasmid	2,5 µg	24
BMP-Plasmid	12,5 µg	7
BMP-Plasmid	25 µg	8
BMP-Plasmid	50 µg	13
BMP-Plasmid	100 µg	13

Tab. 3-4 Gruppeneinteilung

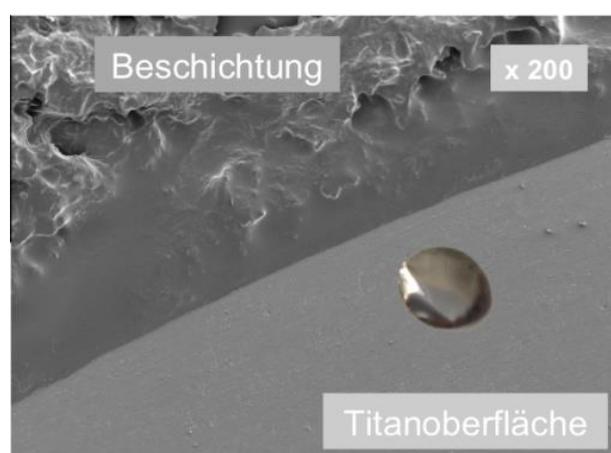


Abb. 3-5 Übergangszone PDLLA – Titan
REM-Ansicht 200x

Die Inhomogenität der Gruppengrößen resultierte aus der ursprünglichen Annahme, dass eine Beschichtung mit 2,5µg ein rhBMP-2 äquivalentes Ergebnis zeigen sollte. Im Rahmen von ersten Versuchsreihen konnte jedoch mit höheren Konzentrationen eine weitere Steigerung der Osteoinduktion nicht ausgeschlossen werden, so dass hier eine weitere Diversifikation der Gruppen erfolgte.

Auf den Einsatz unbeschichteter Implantate konnte verzichtet werden, da bereits in einer voraus gegangenen Studie [Deppe 2003a] der ausbleibende Effekt auf die Osteoinduktion gezeigt werden konnte. Weiterführende radiologische, mikrocomputer-tomographische, histomorphometrische und histologische Untersuchungen konnten umfassende Aussagen über Quantität

und Qualität des neugebildeten Knochens und der umgebenden Weichgewebe liefern und sind bereits ausführlich besprochen worden [Kolk 2007].

3.2.2 Haltung und Ernährung

Die Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Operation 6 Monate alt und wiesen ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 500g auf. Die Unterbringung und Betreuung der Tiere erfolgte im Zentrum für präklinische Forschung der TU München. Um einen hormonellen Einfluss durch das in den Knochenstoffwechsel eingreifende Hormon Östrogen auszuschließen wurde auf die Verwendung von weiblichen Versuchstieren verzichtet. Die Unterbringung erfolgte in Dreiergruppen in Makrolonkäfigen auf Holzgranulateinstreu mit Zellstoff und anderen Nestbau-Materialien. Frisches Wasser und Altromin Trockenfutterpellets standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Im Tierstall herrschte eine konstante Temperatur von 23°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden.

3.2.3 Operationstechnik

Wegen des hohen Stoffwechselgrundumsatzes der Versuchstiere wurde auf eine präoperative Nahrungskarenz verzichtet. Die Narkose wurde durch intramuskuläre Injektion von Medetomin (150µg/kgKG), Midazolam (2µg/kgKG) und Fentanyl (5µg/kgKG) eingeleitet. Die Tiere wurden seitlich liegend auf dem OP-Tisch gelagert, mit Sauerstoff (1l/min) versorgt und an ein Pulsoxymeter angeschlossen. Das Operationsgebiet wurde rasiert und desinfiziert. Der Zugang erfolgt über eine submandibuläre Inzision. Nach Darstellung der Masseter-Pterygoid-Schlinge am unteren Rand des Unterkiefers wurde diese im knöchernen Anteil abgelöst und das Periost im Basalbogenansatzbereich durchtrennt. Nach vorsichtiger subperiostaler Präparation des Kieferwinkels konnte der critical-size-defect etwa 2mm kranial des Basalbogens und 2mm ventral des aufsteigenden Unterkieferastes im Kieferwinkel gesetzt werden. Für die Defektpräparation wurde ein Trepanbohrer mit einem Außendurchmesser von 5mm gewählt. Zur Schonung des umgebenden Knochens war es notwendig die Bohrung mit geringer Drehzahl und unter ständiger Kühlung mit steriler Kochsalzlösung durchzuführen. Der Bohrkern konnte mit einem Skalpell entfernt werden. Blutungen aus der A. und V. alveolaris inferior wurden durch Elektrokoagulation gestillt. Nachdem das Operationsfeld gespült und der Defektbereich gesäubert und getrocknet wurde, konnte die im Durchmesser 8mm große beschichtete Titanfolie

zentral auf dem Defekt platzieren werden. Nach der Readaptation der Masseter-Pterygoid-Schlinge mit Vicryl 4.0 (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) erfolgte der dichte Wundverschluss durch Hautnaht mit Vicryl 3.0 (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) und die Abdichtung der Wundfläche mit einem Nobecutan Sprühverband (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) (Abb. 3-6). Durch die Verwendung resorbierbaren Nahtmaterials war eine Nahtentfernung nicht notwendig. Die Operationsdauer lag bei 30-45 Minuten. Zur Antagonisierung der Narkose wurde den Ratten nach Abschluss des operativen Eingriffs Atipamizol (0,75mg/kgKG), Flumazenil (200µg/kgKG) und Naloxon (120µg/kgKG) verabreicht. Zur Anregung des Stoffwechsels und zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren noch vor der Aufwachphase eine Mischung aus 5ml Ringerlösung, 50mg/6h Metamizol und 0,2 mg/KG/24h Meloxicam subcutan injiziert.

3.2.4 Postoperative Versorgung

Für die ersten 24h post operationem wurden zum Schutz gegen Unterkühlung Wärmelampen eingesetzt und die Tiere in wärmende OP-Tücher gewickelt. Zur Infektionsprophylaxe wurden für die ersten Tage der Holzgranulateinstreu in allen Käfigen durch Zellstoffbahnen ausgetauscht. Die Tiere wurden täglich durch einen Veterinärmediziner visitiert und durch Tierpfleger betreut. Zur Analgesie und Schwellungsprophylaxe wurde den Tieren regelmäßig 0,06ml Meloxicam per os verabreicht. Dabei handelt es sich um ein nicht steroidales Antiphlogistikum ohne knochenbildungshemmende Wirkung. Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme wurde darauf geachtet, dass in der ersten postoperativen Phase das Trockenfutter eingeweicht wurde.

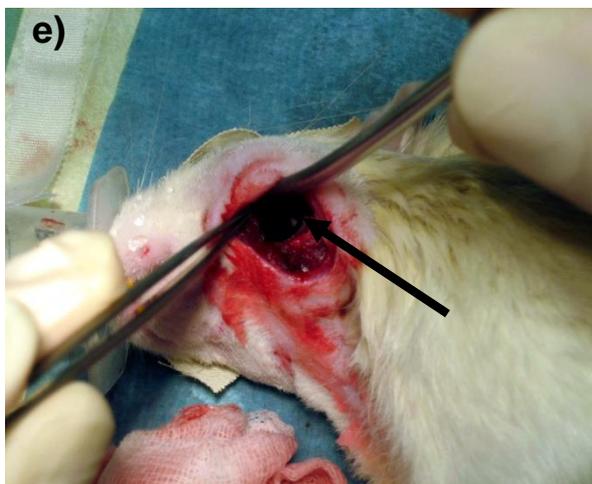
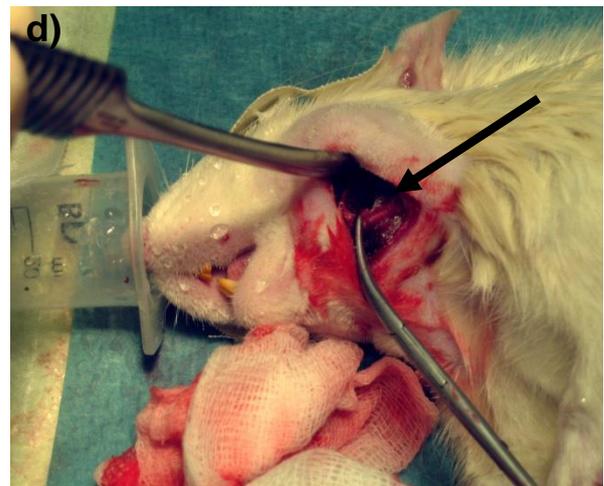
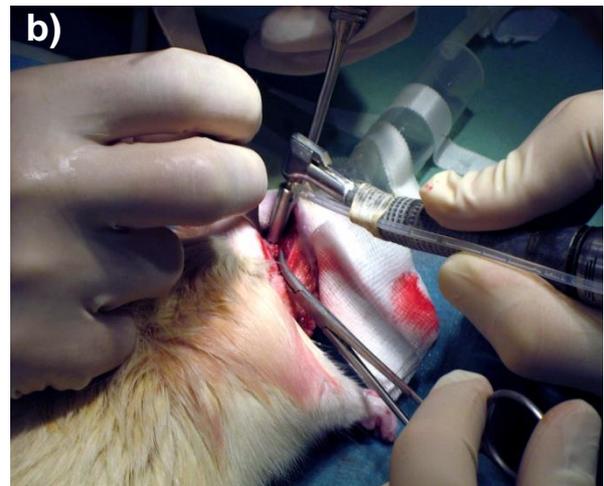
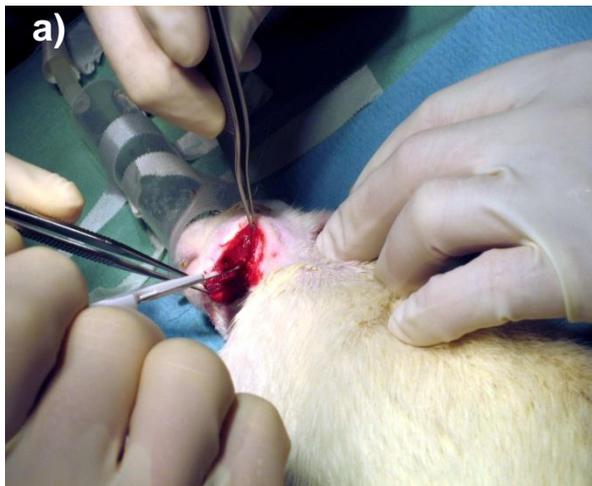


Abb. 3-6 Ablauf der Operation [Kolk 2007]

- a) Eröffnung und Darstellung des Kieferwinkels
- b) Trepanation des 5mm durchmessenden critical-size-defects
- c) Entnahme des Bohrkerns mit einem Skalpell
- d) Defektbereich dargestellt
- e) Positionieren des Implantates
- f) Fixieren der Muskelschlinge und anschließende Hautnaht

3.2.5 Polychrome Sequenzmarkierung im Tierversuch

Fluorochrom	Dosierung [mg/kg]	Gabe am Tag
Calzeinblau	30	6
Xylenolorange	90	13
Calzeingrün	15	20
Alizarinkomplexon	30	27

Tab. 3-5 Fluorochromschema

Die Herstellung und Verabreichung der Fluorochrome erfolgte in Analogie zu den Vorversuchen (Seite 23). Bei den Tieren des Hauptversuchs wurde eine vierfach Markierung gewählt (Tab. 3-5). Dabei wurden den Tieren in regelmäßigen Abständen am 6. Tag Calzeinblau, am 13. Tag Xylenolorange, am 20. Tag Calzeingrün und am 27.

Tag Alizarinkomplexon subcutan injiziert. Mit diesem Schema wurde eine intravitale Knochenmarkierung des neugebildeten Knochens über einen Zeitraum von ca. 24h-36h erzeugt.

3.2.6 Tötung und Präparation

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte am 28., 56., oder 112. Tag. Zunächst wurden die Tiere in einer Plastikbox durch Inhalation von Isofluran narkotisiert. Gemäß EU-Empfehlung [Close 1996, 1997] erfolgte die Tötung durch eine Überdosis Narcoren (Merial, Deutschland).

Die Entnahme der Unterkiefer erfolgte über einen medianen submandibulären Zugang bei der auf dem Rücken liegenden Ratte. Nach Darstellung der Unterkieferbasis konnte die Masseter-Pterygoid-Schlinge scharf durchtrennt werden und eine vorsichtige Präparation medial und lateral in die Tiefe durchgeführt werden. Insbesondere eine Verletzung der Weichgewebe um den Defektbereich als auch eine Dislokation des Titanimplantes galt es zu vermeiden. Deswegen wurde die umgebende Muskulatur teilweise belassen, um nach Explantation des gesamten Unterkieferknochens, die Weichgewebemanschette kontrolliert zu reduzieren. Die Kieferhälften wurden in 100%igem Methanol in Zentrifugenröhrchen bei 2-4°C im Kühlschrank gelagert. Die Präparation des Defektbereichs erfolgte mit einer oszillierenden Diamantsäge, so dass abschließend ein ca. 1,5 cm durchmessendes Präparat des Kieferwinkels mit zentral gelegenem Defektbereich und koronarer Schnittebene vorlag.

3.2.7 Auswertung

Grundlage der Fluorochromdarstellung in dieser Arbeit war die Bestimmung einer so genannten region-of-interest (ROI) an den ungefärbten Schnitten. Dabei handelt es sich

um einen möglichst großen, in allen Schnitten reproduzierbaren Bereich der Knochenneubildung. In diesem Versuch wurde die Wachstumszone am Übergang zur Bindegewebsbrücke gewählt, wobei immer der defektnahe Anteil des originären Knochens die äußere Begrenzung des Präparates darstellte. Nach Lokalisation der Regionen der Knochenneubildung unter Auflichtfluoreszenz wurden zunächst aus einer definierten Schicht des Präparates zwei Aufnahmen akquiriert (Abb. 3-7). Hierzu wurde eine Lambda-Stack von 410nm bis 660nm erhoben. Zur Exzitation dienten die Laserlinien des Argon-Lasers bei 488nm mit einer Stärke von 10% und des Multiphotonenlasers bei 800nm mit einer Stärke von 100%. Hierbei ist zu beachten, dass bei dieser Einstellung die Exzitationswellenlänge durch den Multiphotonenlaser bei ca. 400nm liegt. Als Beam-Splitter kam der HFT 488/700 zum Einsatz. Das Pinhole wurde auf 200nm eingestellt. Unter Verwendung des Plan-Apochromat Objektivs mit 20x Vergrößerung und einer NA von 0,75 konnte eine Kantenlänge des quadratischen Bildausschnitts von 651µm erreicht werden.

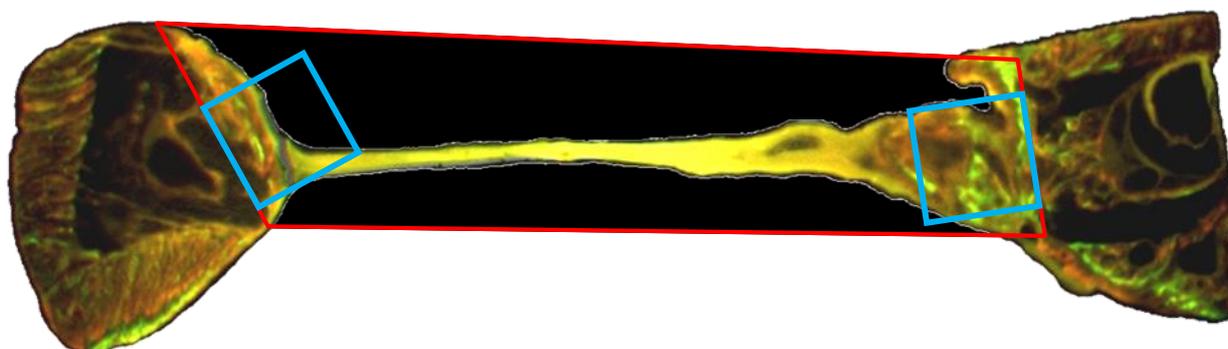


Abb. 3-7 Auswertungsverfahren der polychromen Sequenzmarkierung

Übersichtsaufnahme mit Auflichtfluoreszenz (1,25x Vergrößerung Filtersatz 01); critical-size-defect (Schwarz mit rotem Rand) mit 5mm Durchmesser, region-of-interest (ROI, blauer Rand) in paralleler Ausrichtung zum nicht fluoreszierendem originären Knochen, rechts kaudaler Anteil mit Zahnwurzel

Das Prozessieren des Datensatzes erfolgte entsprechend der im Rahmen der Vorversuche erhobenen Parameter mittels der AIM Bildanalysesoftware (Fa. Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Nachdem die digitalen Bilddaten für die einzelnen Fluorochrome errechnet waren, konnte die Flächenberechnung des neu gebildeten Knochens durchgeführt werden. Hierzu wurde die Bildbearbeitungssoftware *Image J* verwendet. Das Programm wird als Freeware vom NIH (U.S. National Institutes of Health) unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/> einschließlich Quellcodes und umfangreicher Dokumentationen zur Verfügung gestellt. Im ersten Schritt wurden die Bildinformationen der einzelnen Fluorochrome in Einzelbilder getrennt dargestellt. Nach Kontrastverschärfung und Anpassung der Sättigung (Abb. 3-8) wurden die Bildinformationen in einen monochromatischen Datensatz umgewandelt (Abb. 3-9). Dieser Arbeitsschritt ist nicht automatisierbar son-

dern muss manuell vorgenommen werden, da die Fluorochrome erheblich unterschiedliche Leuchtstärken aufweisen. Auf Basis dieser Daten konnten dann die absolute Fläche in μm^2 ausgegeben werden die von einem definierten Fluorochrom gefärbt wurde und der Fläche des neugebildeten Knochens in diesem Zeitabschnitt entspricht (Abb. 3-10).

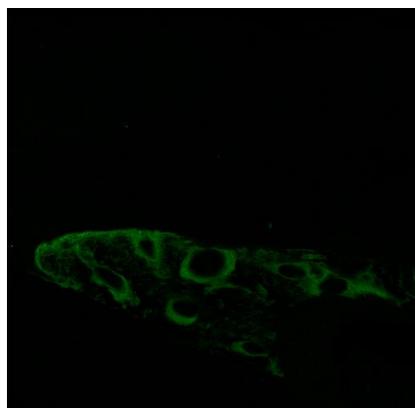


Abb. 3-8 Kontrastverstärkung und Anpassung der Sättigung
Calzeingrün, BMP-2-Plasmid 50 μg



Abb. 3-9 Monochromatische Umwandlung
Calzeingrün, BMP-2-Plasmid 50 μg



Abb. 3-10 automatische Flächenberechnung
Calzeingrün, BMP-2-Plasmid 50 μg

Für die Berechnung des zeitlichen Verlaufs war die prozentuale Verteilung des neu gebildeten Knochens in der ROI ausschlaggebend. Die Gesamtfläche von 100% entsprach der Fläche des neu gebildeten Knochens in beiden regions of interest in einem Präparat. Hierbei ist zu beachten, dass lediglich der neu gebildete Knochen während eines Färbintervalls eine Fluoreszenz aufweist. Sowohl der originäre Knochen, als auch der neue Knochen der sich zwischen den Färbungen gebildet hat wird nicht in die Flächenmessungen einbezogen. Der jeweilige Anteil der vier Fluorochrome an der Gesamtfläche gab somit das Abbild der Knochenwachstumsaktivität in einem definierten Zeitintervall wieder.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit SPSS Statistics 19.0 (IBM, Armonk, USA). Eine Normalverteilung innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen war nicht gegeben, so dass die Darstellung mittels Median und 25% und 75% Quantile als Boxplot gewählt wurde. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde für den Vergleich der Dosierungen pro Untersuchungszeitpunkt der Mann-Whitney-U Test verwendet, für den Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Dosierung kam der Wilcoxon-Vorzeichentest zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurden mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung wurde vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München betreut.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der polychromen Sequenzmarkierung und der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

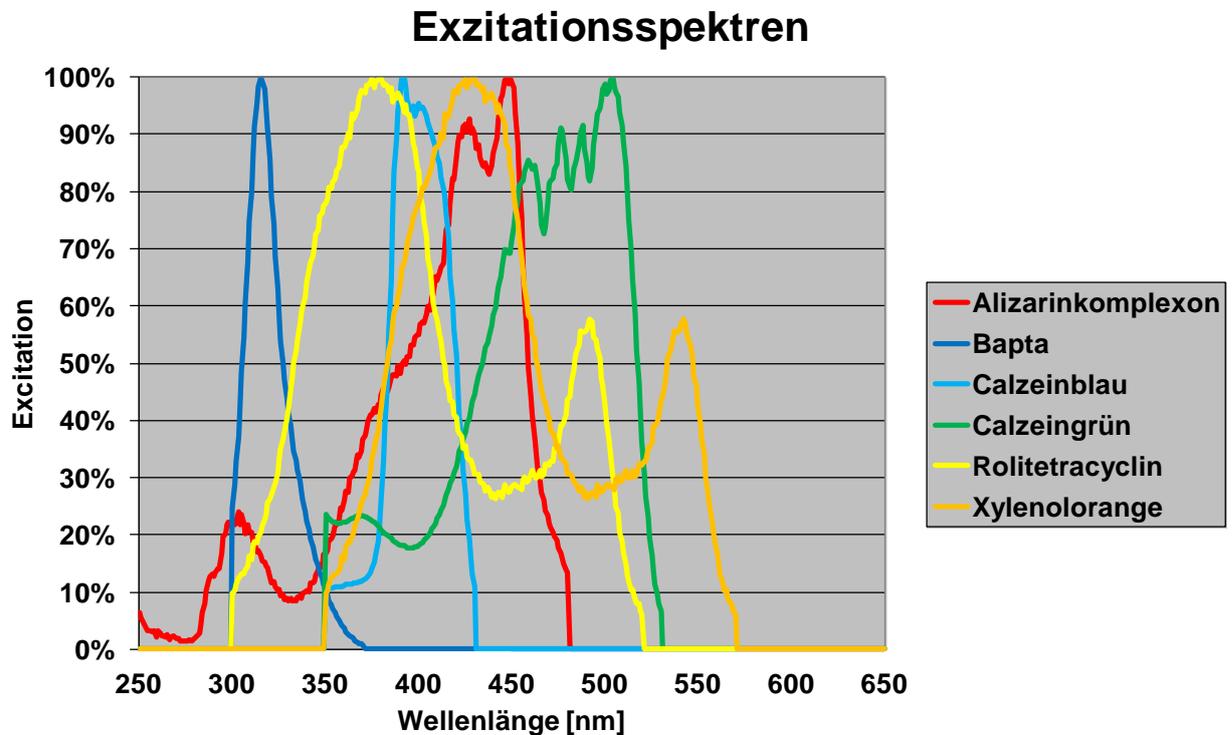


Abb. 4-1 Exzitationsspektren

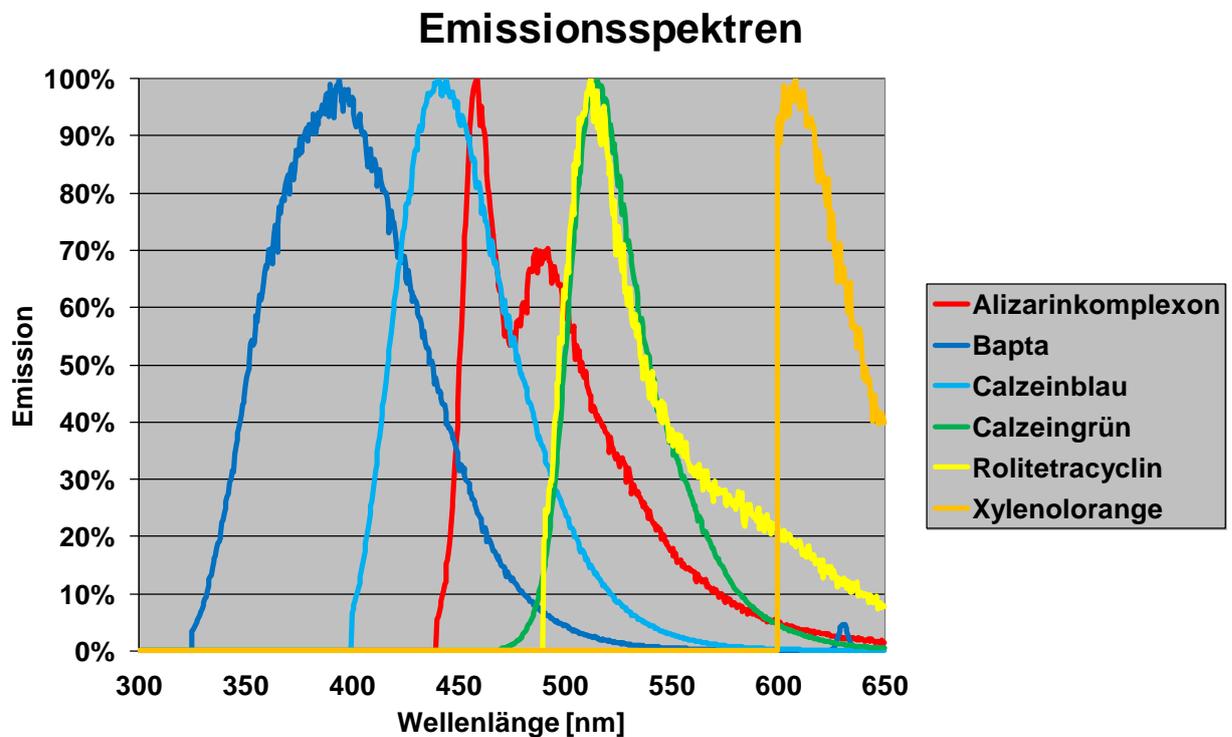


Abb. 4-2 Emissionsspektren

In der ersten Phase des Versuchs galt es Erregungsspektren der ausgewählten Fluorochrome darzustellen (Abb. 4-1). Die Spektren geben wieder, wie stark die Emission der Fluorochrome bei Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge ist. Fällt man das Lot über dem höchsten Ausschlag, ergibt sich die optimale Exzitationswellenlänge.

Fluorochrom	Excit [nm]	Em [nm]
Calzeinblau	390	440
Xylenolorange	425	610
Calzeingrün	500	515
Alizarinkomplexon	470	460
Rolitetracycline	380	510
BAPTA	315	395

Tab. 4-1 Exzitations- und Emissionsmaxima

Die Literaturwerte (Tab. 3-1) konnten in diesem Versuchsaufbau (Kap. 3.1.1) nur in Näherung bestätigt werden.

Eine entscheidende Zusatzinformation aus dieser Untersuchung war der Verlauf der Exzitationsspektren. Je steiler der Kurvenverlauf, desto näher muss die Exzitation am Maximum erfolgen. Gute Beispiele für derartige Fluorochrome sind Bapta und Calzeinblau. Im Gegensatz dazu besteht in Bereichen, in denen sich die Exzitationsspektren bei einer starken Emission überlappen die Möglichkeit, mit einer Laserlinie mehrere Fluorochrome anzuregen. Unter diesem Gesichtspunkt lassen sich die Fluorochrome hinsichtlich ihres Exzitationsspektrums in drei Gruppen teilen. Gruppe 1 besteht aus Bapta, Gruppe 2 aus Rolitetracyclin, Calzeinblau, Xylenolorange und Alizarinkomplexon und Gruppe 3 aus Calzeingrün. Die Exzitationsmaxima der Gruppe 2 liegen alle zwischen 380nm und 470nm. Am Kurvenverlauf ist ablesbar, dass im Bereich von 400nm eine Schnittmenge liegt, bei der alle Fluorochrome über 60% ihrer Emission erreichen. Limitierend wirken hier der Kreuzungspunkt der Spektren von Alizarinkomplexon und Rolitetracyclin, sowie der steile Kurvenverlauf von Calzeinblau. Zu beachten ist zudem, dass der zweite Exzitationspeak des Rolitetracyclins bei 490nm eine Ko-Exzitation mit Calzeingrün ermöglicht. Ein ungewöhnliches Exzitationsverhalten wies in diesem Versuch das Alizarinkomplexon auf. Es fällt der ungewöhnlich flache Anstieg im kurzwelligen Bereich auf, der in einem sehr späten Peak bei 470nm mündet.

Auf Basis der gewonnenen Werte konnten dann in der zweiten Phase die Emissionsspektren der Fluorochrome ermittelt werden. Die Emissionmaxima (Tab. 4-1) stellten sich in ihrem typischen Verlauf mit einem im kurzwelligen Bereich steilem Anstieg und dem in den langwelligen Bereich abgeflachten Abfall dar. Bei der Betrachtung der Spektren fällt auf, dass die Peaks von Calzeinblau und Alizarinkomplexon sowie von Calzeingrün und Rolitetracyclin sehr eng zusammenliegen. Auch hier wird deutlich wie entscheidend das Wissen um das gesamte Emissionsspektrum der Fluorochrome ist um eine spätere

Differenzierung durchführen zu können. So ist bei Alizarinkomplexon ein auffälliger Doppelpeak zu vermerken, während bei Rolitetetracyclin gegenüber Calzeingrün eine deutliche Abflachung des Emissionsspektrums ab 550nm zu beobachten ist.

Mit den gewonnenen Daten konnte jetzt die Auftrennung der Spektren am CLSM 510 META NLO erfolgen. Unter Berücksichtigung der Fragestellung dieser Arbeit wurde die Auswertung in einer einzigen Messung angestrebt. Hier musste erkannt werden, dass sowohl die Anregung von Bapta bei 315nm als auch die Anregung der Fluorochrome der Gruppe 2 bei ca. 400nm nicht in einer Messung kombinierbar waren. Für eine Anregung in diesem kurzwelligen Bereich ist nur der Multiphotonen-Laser geeignet. Eine Umstellung der Wellenlänge hätte jedoch für jede Messung den Neustart des gesamten Systems notwendig gemacht. Als Konsequenz wurde die Darstellung einer Fünffachmarkierung mit Calzeinblau, Xylenolorange, Calzeingrün, Alizarinkomplexon und Rolitetetracyclin gewählt. Die Anregung von Calzeingrün erfolgte mit dem Argon-Laser bei 488nm und einer Stärke von 10%, alle anderen Fluorochrome wurden mit dem Chameleon-Laser bei 800nm und einer Stärke von 100% angeregt. Dies war notwendig, da die Leuchtkraft des Calzeingrüns deutlich höher ist als die der anderen Fluorochrome und eine Überlagerung der Fluoreszenzen möglichst ausgeschlossen werden sollte. Auf diese Weise gelang die Extraktion der Fluorochromspektren mittels ACE in einer einzigen Messung. Die Detektion erfolgt mit dem META-Detektor. Nach Speicherung der Spektren in der Fluorochrom Datenbank standen diese auch für die Auswertung des Tierversuchs zur Verfügung.

Nach der Akquise des Lambda Stacks lag ein Bild vor, bei dem für jedes Pixel die Emissionssignatur über die gesamte Breite des gemessenen Spektrums aufgezeichnet ist. Beim Linear Unmixing können die Fluorochrome aufgrund der spezifischen und bekannten Emissionssignatur automatisch in 5 Kanäle getrennt werden, die dann wie beschrieben ausgewertet werden können (Abb. 4-5).

Das CLSM 520 NLO META bietet darüber hinaus die Möglichkeit einer dreidimensionalen Darstellung. Durch Verlegen der Fokusebene in die Tiefe des Präparats können in eine Schichtdicke von 1µm Lambda Stacks bis in eine Tiefe von 50µm vermessen werden. Nach Linear Unmixing erhält man analog zur zweidimensionalen Auswertung eine Darstellung der einzelnen Fluorochrome (Abb. 4-3). Nach Rekonstruktion des Datensatzes kann so ein dreidimensionales Modell der region of interest erzeugt werden welches sich frei im virtuellen Raum bewegen lässt (Abb. 4-4).

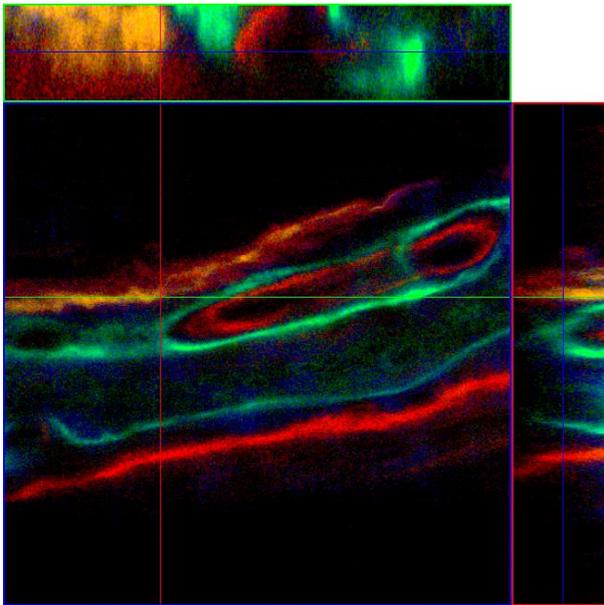


Abb. 4-3 3D Darstellung
50µm dicke Schichtung in 1µm Schnitten, 20x,
2,5µg BMP-Plasmid

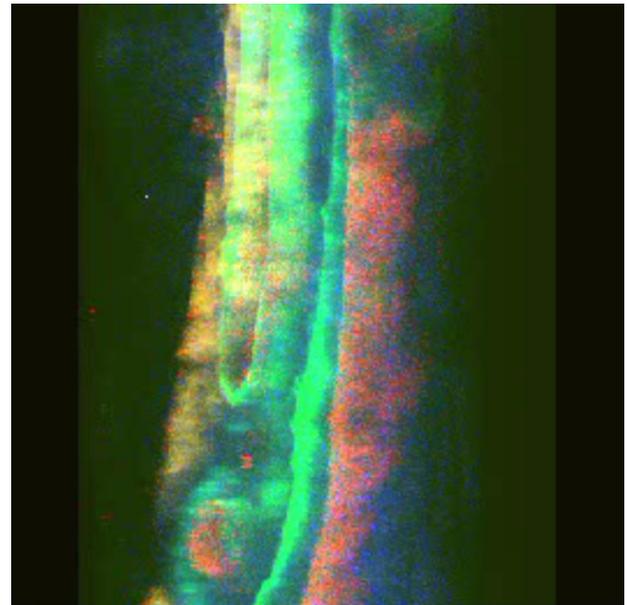


Abb. 4-4 3D Rekonstruktion
50µm dicke Schichtung in 1µm Schnitten, 20x, 2,5µg
BMP-Plasmid

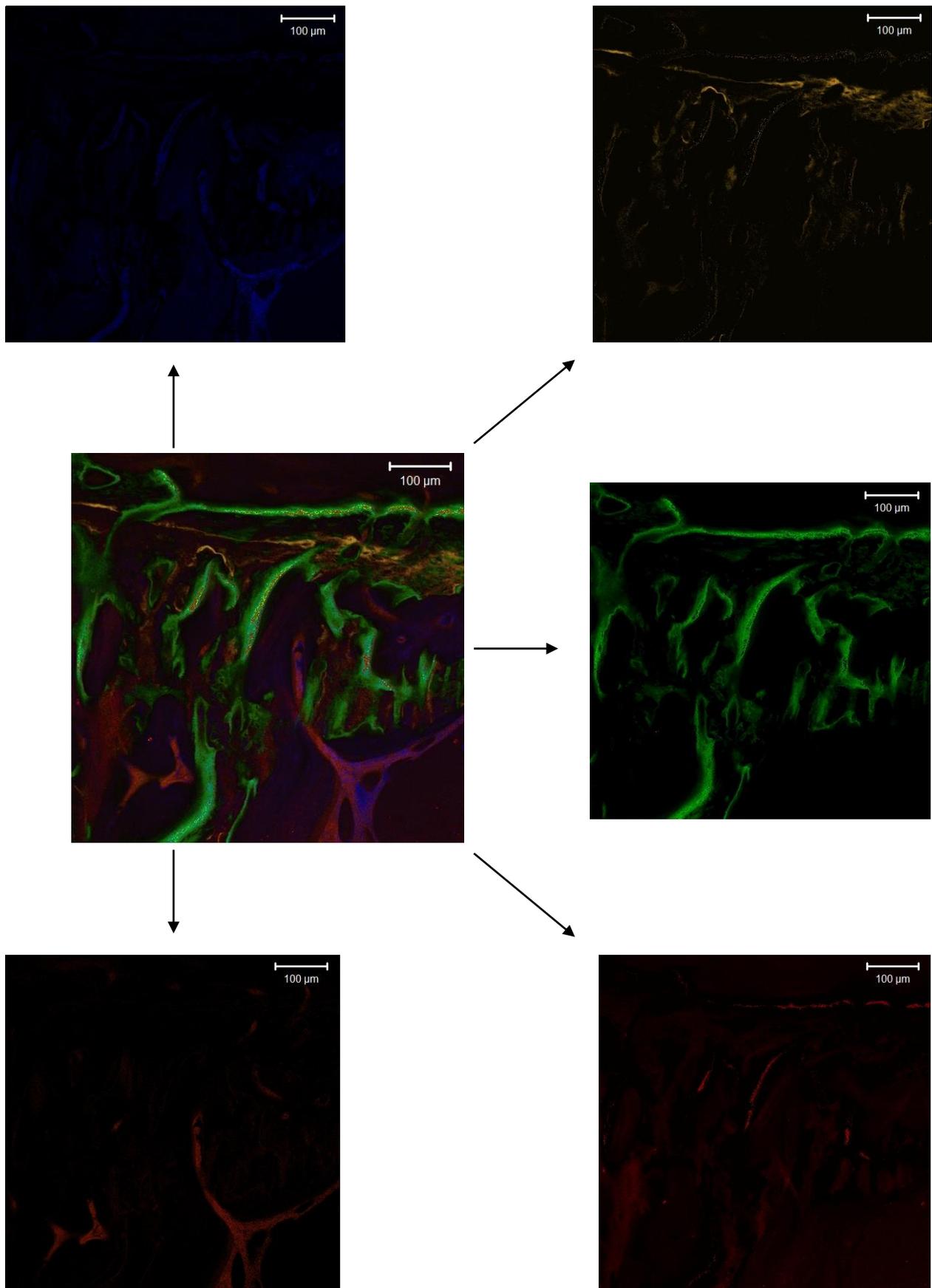


Abb. 4-5 Linear Unmixing

50µg BMP-Plasmid, 20x, CLSM; zentral links: 5-Kanal Bild; im Uhrzeigersinn.: Calzeinblau, Xylenolorange, Calzeingrün, Aliziarinkomplexon, Rolitetracyclin

4.2 Ergebnisse Tierversuch

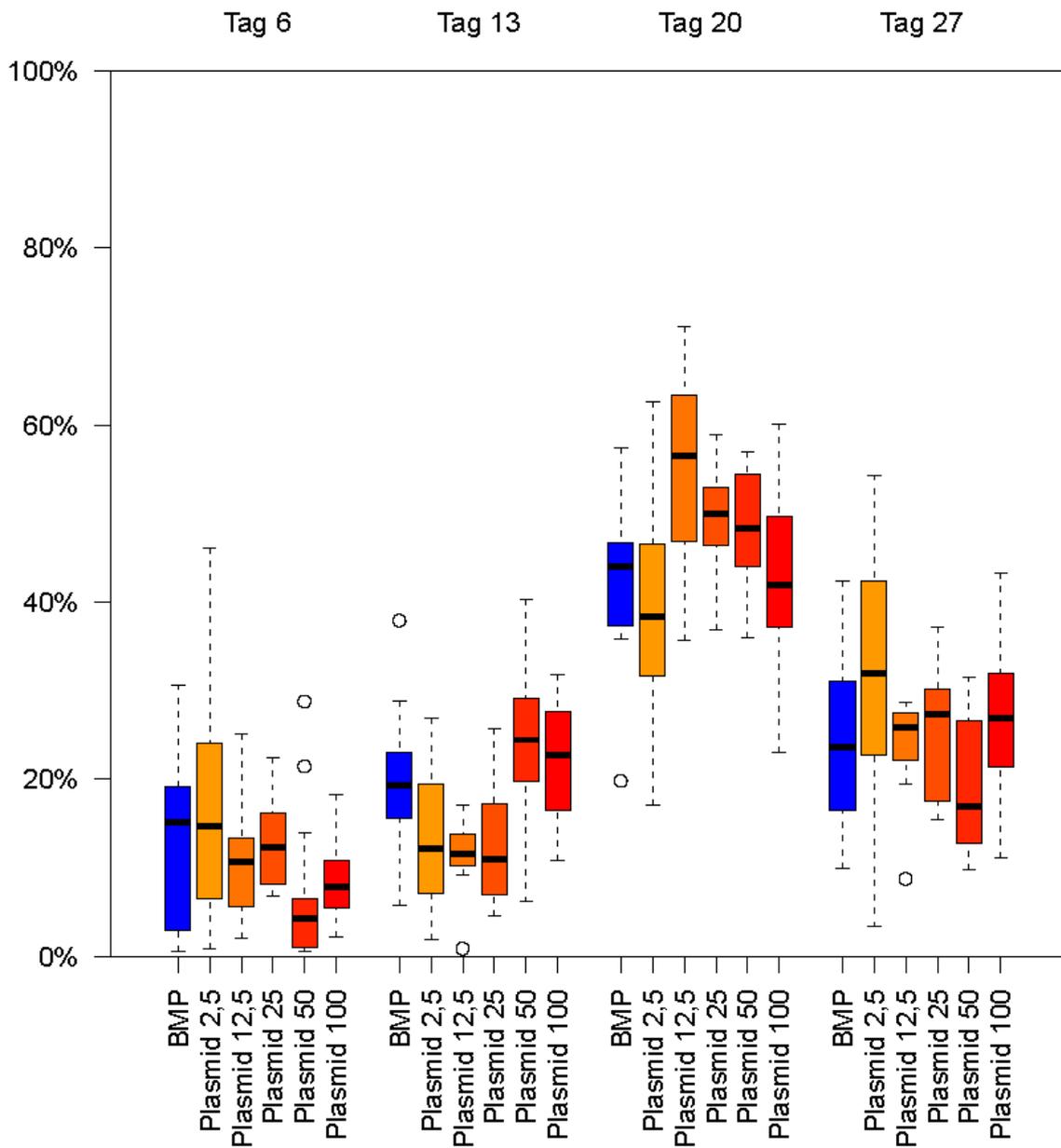


Abb. 4-6 Wachstumsaktivität zu Untersuchungszeitpunkten

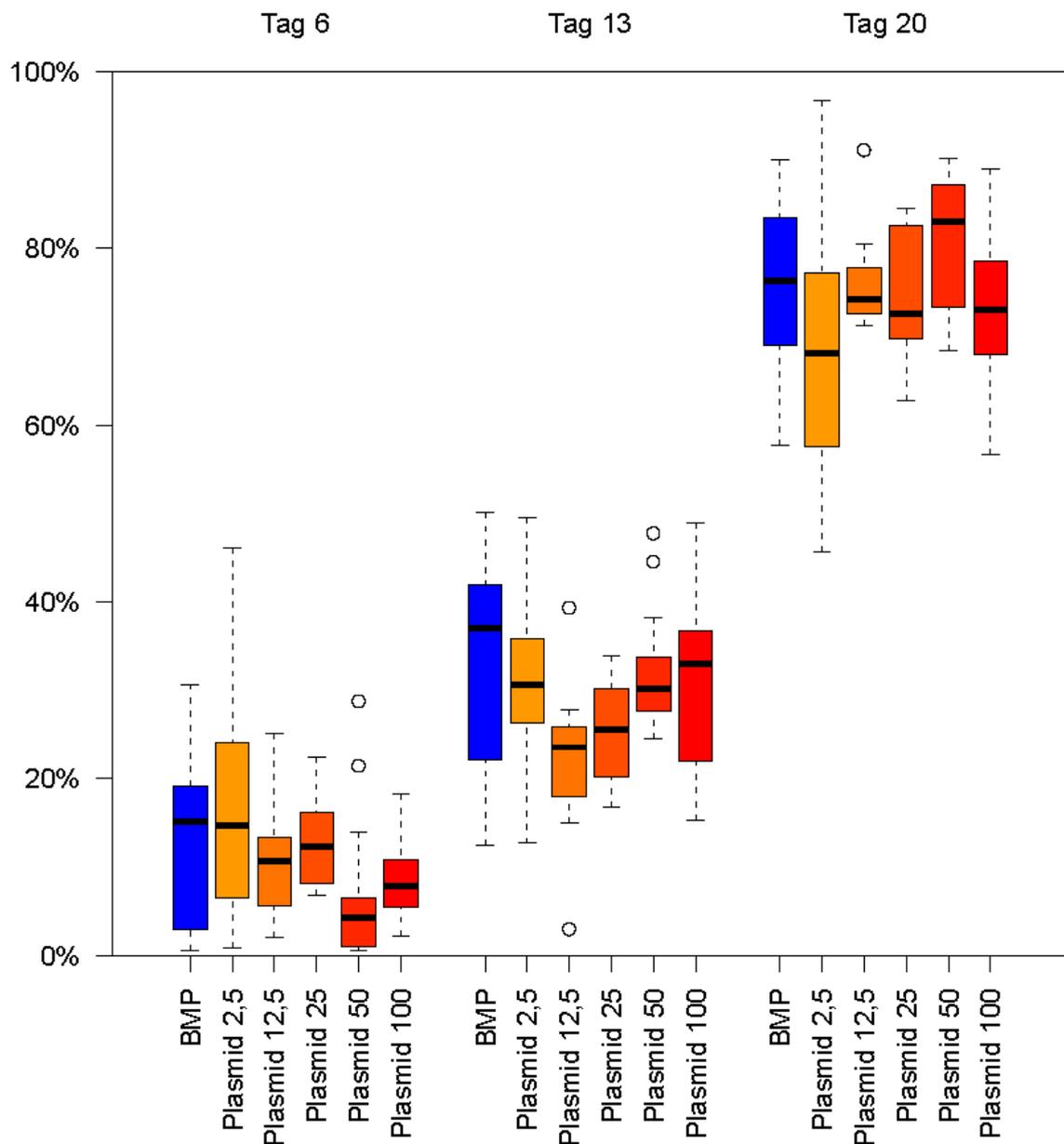


Abb. 4-7 Kumulative Wachstumsaktivität zu Untersuchungszeitpunkten

Die Angabe der Verteilung der Knochenwachstumsaktivität zu den vier Untersuchungszeitpunkten erfolgt in Prozenten. In Abb. 4-6 wird für jeden Untersuchungszeitpunkt der prozentuale Anteil am markierten Knochen wiedergegeben. Die Summe der Werte pro Gruppe ergibt demnach 100% und entspricht der Gesamtheit des neu gebildeten markierten Knochens. In Abb. 4-7 wurde eine kumulative Darstellung der Werte gewählt um die Wachstumsaktivität im Verlauf herauszustellen. Auf die Angabe der Werte für den Untersuchungszeitpunkt am Tag 27 kann in dieser Anordnung verzichtet werden, da das kumulative Wachstum des markierten Knochens für alle Gruppen 100% entspricht. Hieraus ergibt sich, dass die Knochenwachstumsaktivität für den Untersuchungszeitpunkt am Tag 6 in beiden Darstellungen identisch ist. Eine Aussage über die Quantität und die Qualität des neu gebildeten Knochens erfolgt in dieser Untersuchung nicht.

Alle Gruppen zeigten eine geringe Aktivität zum ersten und zweiten Untersuchungszeitraum und die stärkste Knochenwachstumsaktivität an Tag 20. Am letzten Untersuchungszeitpunkt an Tag 27 war bereits wieder eine prozentuale Abnahme der Aktivität in allen Gruppen feststellbar.

4.2.1 Ergebnisse Gruppe rhBMP-2

Bei den Tieren der BMP-2-Gruppe zeigt sich für die ersten beiden Untersuchungszeitpunkte eine ebene Knochenwachstumsaktivität. Bereits nach 6 Tagen waren 15,1% des letzten Endes markierten Knochens gebildet worden, weitere 19,3% waren nach 13 Tagen kalzifiziert. Der Phase der höchsten Knochenaktivität lag im Zeitfenster am Tag 20. Hier wurden 44,1% des gesamten markierten Knochens gebildet. Nach 4 Wochen waren entsprechend des Messverfahrens 100% der Knochenneubildung erreicht, wobei auf den letzten markierten Zeitraum lediglich 23,7% entfielen.

Zu den Tieren aller Plasmidgruppen bestand zum Untersuchungszeitpunkt an Tag 6 kein signifikanter Unterschied. Das Signifikanzniveau zur Gruppe Plasmid 25µg lag mit $p=0,9535$ am höchsten zu allen Gruppen der Versuchstiere. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt konnte für die Plasmid-Gruppen mit 2,5µg, 12,5µg und 25µg eine signifikant geringe Knochenaktivität gemessen werden. Diese lag gegenüber der Plasmid 12,5µg Gruppe auch noch am dritten Untersuchungszeitpunkt mit $p=0,039$ signifikant niedriger.

4.2.2 Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 2,5µg

Die Gruppe Plasmid 2,5µg war mit n=24 Tieren die größte Gruppe in diesem Versuch. Bei dieser Gruppe zeigte sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt eine der Referenzgruppe vergleichbare Knochenwachstumsaktivität von 14,7%. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt kam es zu einem Rückgang der Knochenwachstumsaktivität auf 12,2%. Auch die starke Zunahme der Aktivität zum Untersuchungszeitpunkt an Tag 20 lag mit 38,4% deutlich unter der Referenzgruppe die eine Aktivität von 44,1% aufwies. Aus dem Versuchsaufbau ergab sich, dass ein Ausgleich zum vierten Untersuchungszeitpunkt am Tag 27 erfolgen musste. Hier zeigten die Tiere der Gruppe Plasmid 2,5µg mit einem Anteil von 31,9% die stärkste und damit späteste Aktivität von allen Gruppen.

Die besonders frühe Aktivität an Tag 6 führte zu einer Signifikanz von $p=0,0109$ gegenüber der schwachen Plasmid 50µg Gruppe. Dieses Verhältnis kehrte sich zum zweiten Untersuchungszeitpunkt um. Hier zeigte die Gruppe Plasmid 2,5 eine signifikant geringe Aktivität gegenüber den Plasmid Gruppen mit 100µg ($p=0,0068$), 50µg ($p=0,0016$) und der BMP Gruppe ($p=0,0245$). Dieser Effekt bestätigt sich gegenüber der Plasmid 50µg Gruppe auch zum dritten ($p=0,0083$) und vierten ($p=0,0156$) Untersuchungszeitpunkt, während er für die Gruppen Plasmid 12,5µg ($p=0,014$) und Plasmid 25µg ($p=0,0148$) lediglich am Untersuchungszeitpunkt an Tag 20 nachgewiesen werden kann.

4.2.3 Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 12,5µg

Die Knochenwachstumsaktivität der Gruppe Plasmid 12,5µg zeigte sich zu den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten mit 10,7% an Tag 6 und 11,6% an Tag 13 deutlich schwächer als in der Referenzgruppe. Die verhältnismäßig und auch absolut stärkste Knochenwachstumsaktivität wurde in dieser Gruppe zum dritten Untersuchungszeitraum mit 56,5% gemessen.

Zum Zeitpunkt Tag 20 lag eine gegenüber der Plasmid 2,5µg Gruppe signifikant erhöhte Knochenwachstumsaktivität vor ($p=0,014$).

4.2.4 Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 25µg

Die Knochenaktivität dieser Gruppe zeigt über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zur Referenzgruppe einen sigmoidalen Verlauf. Während die Aktivität in der frühen Phase an Tag 6 mit 12,3% leicht und zum zweiten Untersuchungszeitpunkt an

Tag 13 mit 11,0% deutlich ($p=0,0311$) unterhalb der Referenzgruppe lag, wurde dies erwartungsgemäß zu den beiden späteren Untersuchungszeitpunkten durch eine leicht erhöhte Knochenwachstumsaktivität gegenüber der Referenzgruppe kompensiert.

4.2.5 Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 50 μ g

Zum ersten Messpunkt am 6 Tag zeigt die Gruppe Plasmid 50 μ g mit 4,3% die geringste Knochenaktivität aller untersuchten Gruppen. Im Sinn eines verzögerten Einsetzens der Aktivität wurde für diese Gruppe allerdings am zweiten Untersuchungszeitpunkt an Tag 13 mit 24,4% die höchste Knochenwachstumsaktivität verzeichnet. Dieser Trend setzte sich mit 48,4% auch noch am Untersuchungszeitpunkt drei fort, während es in der Folge an Tag 27 mit 17,0% erneut zu einer deutlich unterdurchschnittlichen Knochenwachstumsaktivität kam. Hier zeigte diese Gruppe erneut die geringste Aktivität aller Gruppen.

In der frühen Phase lag gegenüber den Gruppen Plasmid 2,5 μ g ($p=0,0109$) und Plasmid 25 μ g ($p=0,0205$) eine signifikant geringere Aktivität vor. Dieses Verhältnis kehrte sich zum zweiten Untersuchungszeitpunkt an Tag 13 gegenüber den Gruppen Plasmid 2,5 μ g ($p=0,0016$) und Plasmid 25 μ g ($p=0,0059$) um. Zudem lag mit $p=0,0017$ auch eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber der Gruppe Plasmid 12,5 μ g vor. Hinsichtlich der Gruppe Plasmid 2,5 μ g bleibt das erhöhte Aktivitätsniveau auch am dritten Untersuchungszeitpunkt mit $p=0,0083$ bestehen. An Tag 27 bestand hingegen eine signifikante Minderung der Knochenwachstumsaktivität gegenüber der Gruppe Plasmid 2,5 μ g ($p=0,0156$) und Plasmid 100 μ g ($p=0,0333$).

In der kumulativen Auswertung wurde in dieser Gruppe eine signifikant höhere Knochenaktivität bis Tag 13 von 30,2% gegenüber Plasmid 12,5 μ g mit 23,5% ($p=0,0157$) nachgewiesen. Gleiches gilt für den Untersuchungszeitraum bis Tag 20 mit einer kumulativen Aktivität von 83,0% gegenüber der Aktivität von Plasmid 2,5 μ g mit 68,1% ($p=0,0156$) und Plasmid 100 μ g mit 73,1% ($p=0,0333$).

4.2.6 Ergebnisse Gruppe BMP-2 Plasmid 100 μ g

Entsprechend der schwachen Aktivität der Plasmid 100 μ g Gruppe mit 7,8% an Tag 6 kam es zu einer deutlichen Steigerung der Knochenwachstumsaktivität auf 22,8% zum zweiten Untersuchungszeitpunkt. An Tag 20 zeigte sich mit 41,9% eine geringe, aber der Referenzgruppe ähnliche Aktivität des Knochenwachstums. Dies kehrte sich zum vierten Untersuchungszeitpunkt erneut in eine starke Aktivierung gegenüber der BMP-2 Gruppe um. Während das Aktivierungsverhalten der Gruppen mit einem hohen Plasmidgehalt

von 50µg und 100µg zu den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten noch einen ähnlichen Verlauf hatten, kam es im dritten Untersuchungszeitraum zu einer stärkeren Aktivierung in der Plasmid 50µg Gruppe wo hingegen die Knochenwachstumsaktivität in der Plasmid 100µg Gruppe auch an Tag 27 mit 26,9% über der Referenzgruppe lag.

Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt kam es wie in der Plasmid 50µg Gruppe zu einer signifikant höheren Knochenwachstumsaktivität gegenüber den Gruppen Plasmid 2,5µg ($p=0,0068$), Plasmid 12,5µg ($p=0,0126$) und Plasmid 25µg ($p=0,0169$). Obwohl der Knochenwachstumsaktivität der Gruppen Plasmid 50µg und Plasmid 100µg eine ähnliche Verlaufscharakteristik zeigten, kam es zum vierten Untersuchungszeitpunkt D27 zu einer mit $p=0,0333$ signifikant höheren Aktivität der Plasmid 100µg Gruppe.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung des Einflusses verschiedener Konzentrationen des BMP-2 Plasmids auf die Knochenwachstumsaktivität am critical -size -defect des Rattenunterkiefers. Als Referenzgruppe wurde eine Beschichtung mit 62,5mg rhBMP-2 gewählt. Umfangreiche Voruntersuchungen konnten den Nachweis einer Transfektion der Zielzellen und die Expression von BMP-2 mRNA durch das verwendete Träger-Matrix-Plasmid System bestätigen. In diesem Versuchsaufbau kamen Titanplättchen zum Einsatz, auf denen in einer PDLLA Matrix in COPROGs kondensiertes und geschütztes BMP-2-Plasmid auf einen critical-size-defect am Rattenunterkiefer platziert wurde. Neben der im Folgenden beschriebenen Auswertung einer durchgeführten polychromen Sequenzmarkierung wurden auch histologische, histomorphometrische, mikroradiographische und μ -computertomographische Untersuchungen durchgeführt [Bissinger 2011, Kolk 2007, Stöhrer 2008].

5.1 Diskussion der Methodik

Die Methode der Wahl zur Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Knochenheilungswachstumsaktivität ist die polychrome Sequenzmarkierung [Pautke 2005, Rahn 1976]. Dabei gehen die verwendeten Substanzen, die sogenannten Fluorochrome, nach intravitraler Applikation einen fluoreszierenden Komplex mit den Kalziumionen ein, die während Knochenanbau- und Knochenumbauvorgängen in der durch die Osteoblasten gebildeten Knochenmatrix freiliegen. Werden diese Komplexe angeregt emittieren sie Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches unter dem Mikroskop nachgewiesen werden kann.

Unser Ansatz war es in Orientierung an die vielversprechenden Vorarbeiten von Pautke et. al. [Pautke 2005], eine möglichst große Anzahl an Fluorochromen zur Markierung zu nutzen um eine möglichst hohe Aufschlüsselung des zeitlichen Ablaufs zu erzielen und sich daher von den in der Knochenforschung oft verwendeten 2- bis 3-fach Färbungen mit einer Kombination aus Calzeinblau, Calzeingrün, Xylenolorange oder Alizarinkomplexon abzusetzen. Daher wurden unsere Färbungen für die Vorversuche um BAPTA und Rolitetracycline erweitert.

Erschwerend war, dass der Fokus unserer Untersuchung in der frühen Phase der Knochenheilung liegen sollte. Bei Ratten ist physiologisch keine Osteogenese vor der 2. Woche zu erwarten [van Gaalen 2010]. Wegen der Verwendung potenter, osteoinduzieren-

der Substanzen war es jedoch wichtig auch diese Phase des Versuchs in die Untersuchung einzubeziehen, insbesondere da nachweisbare Kalzifizierungen auch während der Kallusbildung im Rahmen der reparativen Phase der Knochenheilung zu erwarten waren [Wilkins 2005]. Ferner waren diese Informationen über die Initialphase der Knochenregeneration entscheidend, da in dem Versuch eine Beschichtung zur Steuerung der Plasmidfreisetzung verwendet wurde, um einer zu frühen Wachstumsfaktor- bzw. Plasmidfreisetzung entgegen zu wirken.

Die klassische Auswertungstechnik der polychromen Sequenzmarkierung stellt die konventionelle Auflichtfluoreszenzmikroskopie dar. Hierbei wird mit einer Halogenlampe eine Exzitation über ein Wellenspektrum von etwa 350nm bis 700nm erzielt. Durch die Auswahl geeigneter Filter können dann die verwendeten Fluorochrome gleichzeitig oder selektiv dargestellt werden. Diese Methode eignet sich dementsprechend nur für Fluorochrome die zum einen deutlich farblich voneinander differenziert werden können und zum anderen bei denen es zu keiner Überlagerung verschiedener Farbbanden im Präparat kommt. Dies gilt zum Beispiel für das appositionelle Knochenwachstum im Bereich der konzentrischen Knochenlamellen eines Osteons [Rahn 1976]. Die bei unserer Untersuchung im Mittelpunkt stehende frühe Phase der Knochenheilung mit der Ausbildung von Kallus und Geflechtknochen zeigt im Gegensatz dazu einen vielschichtigen und nicht gerichteten Wachstumstyp [Kerschnitzki 2011].

Die Untersuchung der frühen Phase der Knochenheilung machte daher die Entwicklung einer neuen Methode zur Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung notwendig. Einen interessanten Ansatz stellt dabei die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie dar, welche als Mittelweg zwischen der konventionellen Mikroskopie und der Elektronenmikroskopie angesehen werden kann [Watson 1991]. Die Domäne der CLSM liegt in der zellular- und molekularbiologischen Forschung. Durch die Verwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzantikörper können dabei unterschiedliche Proteine in hoher Auflösung dreidimensional dargestellt werden [Zimmermann 2005].

In einer umfassenden Übersichtsarbeit konnte von Jones et al. der Nutzen der CLSM in der Orthopädischen Forschung demonstriert werden. Er hebt die hochauflösende dreidimensionale Darstellung von Mikrostrukturen des Knorpels, des Knochens, der Muskeln, der Sehnen, der Bänder und der Menisci hervor [Jones 2005]. Im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie, bei der 5µm bis maximal 20µm dicke Schnitte des entkalkten Knochens ausgewertet werden können, besteht bei der CLSM die Möglichkeit unentkalkte Knochen-schnitte bis zu einer Dicke von 100µm in die Untersuchung einzubeziehen. Dadurch wird

nicht nur die Herstellung histologischer Knochenschnitte nennenswert vereinfacht, sondern es kommt zudem zu keiner einbettungsbedingten Schrumpfung der Gewebe, die bei den dünnen 5µm Schnitten bis zu 20% betragen kann [Kazama 1993]. Es wurden bereits Untersuchungen zum Ablauf der Knochenheilung an den Extremitäten mittels CLSM vorgenommen. Dabei handelte es sich um eine Doppelmarkierung der Knochenheilung einer Humerusfraktur am Kaninchen mit Xylenolorange und Tetracycline. Hier konnte zum einen gezeigt werden wie sich im Bereich der Havers-Systeme der neu gebildete Knochen zentripetal anlagert und zum anderen, dass sich auch Regionen des neu gebildeten Knochens untersuchen ließen, die einen weitaus komplexeren Wachstumsmuster folgten. Die Markierung wurden zudem in den Wochen vier und sieben vorgenommen, was einer deutlich späteren Phase der Knochenheilung entspricht. Bereits Konijn beschrieb am Rande seiner Untersuchungen die Knochenheilung im Bereich des Kallus als einen „räumlich komplexen, beinahe chaotischen Prozess“ was sich mit unseren Beobachtungen, sowohl bei Betrachtung der Fluoreszenzverteilung auf den zweidimensionalen Schnitten, als auch bei der Beurteilung der dreidimensionalen Aufnahmen deckt [Konijn 1996]. Weder eine quantitative Analyse der Knochenwachstumsaktivität noch eine Erweiterung der polychromen Sequenzmarkierung in vivo auf drei und mehr Fluorochrome sind bis dato beschrieben.

Auch im Bereich der kieferchirurgischen und zahnärztlichen Forschung liegen in Hinblick auf die Untersuchung des Knochens mittels CLSM nur wenige Arbeiten vor. Unter Ausnutzung der Autofluoreszenz wurde von Pilolli et al. die CLSM zur histomorphometrischen Auswertung von Proben humaner Kieferknochen angewendet, welche im Rahmen von implantologischen Maßnahmen gewonnen wurden. Dabei konnten physiologische und pathologische Veränderungen der Knochenstruktur an entkalkten Schnitten dargestellt werden. Zudem wurde eine heterogene Verteilung der Autofluoreszenz beschrieben. Es zeigte sich, dass ältere Knochenareale eine stärkere Autofluoreszenz aufwiesen als junger und neugebildeter Knochen [Pilolli 2008]. Dies deckt sich mit vorrausgegangenen Untersuchungen zur Autofluoreszenz des Knochens [Prentice 1965]. Die Autofluoreszenz des neu gebildeten Knochens spielt daher für unsere Untersuchung eine untergeordnete Rolle, insbesondere da gezeigt werden konnte, dass die blaue Autofluoreszenz des Rattenknochens nicht mit der Calzeinblau-Färbung interferiert [van Gaalen 2010]. Hinsichtlich der Darstellung des Knochenwachstums im Bereich des Gesichtschädels liegt zurzeit nur eine Untersuchung mittels CLSM vor. In dieser Untersuchung

wurde die Knochenaktivität am Knochen-Titan-Interface nach Insertion enossaler Dentalimplantate am Kaninchen anhand einer in vivo Einmalfärbung mit Tetracyclin beschrieben. In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen wurde die beste Qualität dabei an ungefärbten Präparaten erzielt [Piattelli 1994]. Einen ähnlichen Ansatz verfolgte Baschong zur Untersuchung des Gewebe-Titan-Interfaces dentaler Implantate. Der maßgebliche Unterschied dieser Untersuchung lag jedoch in der in vitro Fluoreszenzmarkierung von Aktin, Fibronectin und sm-alpha-Aktin mittels Antikörpern. Dadurch konnten die markierten Proteine in hoher Qualität dargestellt werden, allerdings wurde nur der status-quo bei Explantation der Implantate ohne zeitliche Dynamik wiedergegeben. Der von ihm beschriebene Nutzen der dreidimensionalen Darstellung gilt dementsprechend für die Beurteilung des Gewebe-Titan-Interfaces auf der subzellulären Ebene [Baschong 2001a].

Die Qualität in den von uns generierten dreidimensionalen Darstellungen war durch die abnehmende Exzitation bzw. abgeschwächte Emission der von uns verwendeten Fluorochromen bei zunehmender Schichttiefe limitiert. So ist in Abb. 4-3 (Seite 37) zu erkennen, dass in den oberhalb (grüner Schnitt) und rechts-seitlich (roter Schnitt) dargestellten Schnittebenen ab einer Präparattiefe von etwa 30µm eine deutlich geringere und diffusere Fluoreszenz gemessen werden kann. Verglichen mit der zweidimensionalen Auswertung ist zudem durch eine systembedingte maximale Kantenlänge von 225µm in der Fläche eine deutlich kleinere region-of-interest auswertbar. Eine quantitative Auswertung der Schnitte ist derzeit mit der zur Verfügung stehenden Software, weder von der Firma Zeiss noch von den bekannten Drittanbietern nicht möglich. Aufgrund dieser Einschränkungen ist für die in dieser Arbeit angestrebte Auswertung eine dreidimensionale Auswertung nicht sinnvoll. Der für die Erstellung der dreidimensionalen Aufnahme hohe Zeitbedarf kann als Co-Faktor für diese Einschätzung gewertet werden.

Generell dürfen einige Limitationen der CLSM bei der Untersuchung der Knochenaktivität an critical-size-defects nicht unerwähnt bleiben. So ist systembedingt nur eine, für die Knochenforschung, verhältnismäßig kleine, quadratische region-of-interest mit einer Kantenlänge von 651µm auswählbar. Dies führte dazu, dass pro Probe zwei ROI im Bereich des neu gebildeten Knochens ausgewählt wurden. Eine Vergrößerung der ROI des LSM 510 NLO Meta kann normalerweise durch eine automatische Aufnahme und Anordnung von bis zu 10x10 Einzelaufnahmen (tile scan) erzielt werden. In Kombination mit dem für diese Untersuchung notwendigen linear unmixing, respektive der Anfertigung von

Lambda-Stacks, steht diese Funktion nicht zur Verfügung. Der Vorteil einer überlagerungsfreien Darstellung durch die etwa 1µm hohe Fokusebene wird dabei durch den Verzicht auf die Darstellung eines größeren Probenvolumens erkauft. So kann bei der konventionellen Auflichtfluoreszenzmikroskopie grundsätzlich ein ca. 100µm hoher Schnitt in Gänze dargestellt werden, auch wenn die Beurteilung z.B. in der von uns gewählten Versuchsanordnung nicht möglich ist (Abb. 2-1, Seite 20).

Aufgrund des zu den Untersuchungszeitpunkten noch ungerichteten Knochenwachstums innerhalb des neugebildeten Knochens konnte durch die Auswahl der ROI kein Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchung genommen werden. Dies hätte bei der Beurteilung eines bandenförmigen Knochenwachstums leicht eintreten können, da hier die Erfassung der einzelnen markierten Knochenwachstumszonen einen direkten Einfluss auf das Ergebnis hat. Das Ziel, alle Fluorochrome im Rahmen einer Messung darzustellen, konnte leider nicht erreicht werden. Die synchrone Darstellung von BAPTA und der fünf ausgewerteten Fluorochrome war nicht möglich, da zwei kurzwellige Exzitation bei 315nm für BAPTA und 400nm für Calzeinblau, Rolitetracycline und Xylenolorange einen Neustart des Mikroskops und der Laser sowie eine Neuausrichtung der Probe bedurft hätten. Dies hätte unweigerlich zu einer Beeinflussung der Messwerte geführt.

Außerhalb der Grundlagenforschung am Tierversuch hat die intravitale Fluoreszenzmarkierung des Knochens am Menschen als therapeutisches Hilfsmittel im Rahmen der Therapie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose wieder Einzug in die Klinik erhalten [Pautke 2009]. Ein zukünftiger Aspekt könnte die polychrome Sequenzmarkierung mit verschiedenen Tetracyclinen am Menschen darstellen. Dadurch könnte eine Wiederholung der Tetracyclinmarkierung mit einem zweiten Tetracyclinderivat im zeitlichen Intervall erfolgen, auch wenn das Tetracyclin, welches im Rahmen der Erstgabe verabreicht wurde, noch in der Knochenmatrix gebunden ist. Erste eigene Untersuchungen zu diesem Thema zeigen jedoch noch erhebliche Probleme bei der Differenzierung der verschiedenen Tetracyclinderivate aufgrund der in Lage und Verlauf extrem ähnlichen Emissionsspektren.

Als alternatives Verfahren zur Darstellung der intravitale Knochenwachstumsvorgänge könnte das µCT dienen. Mittels dieser Technik sind bereits jetzt hochauflösende Darstellungen von Knochenproben ex vivo mit einer Auflösung von 1µm Voxelkantlänge möglich. Bei in vivo Untersuchungen am Menschen konnte eine Auflösung von 130µm im Bereich der Extremitäten erzielt werden. Aktuelle Untersuchungen legen einen Schwerpunkt auf die statische Darstellung der Mikroarchitektur des Knochens [Burghardt

2011]. Für eine dynamische Darstellung von Knochenwachstumsvorgängen wären wiederholte, standardisierte μ CT-Untersuchungen in vivo notwendig. Aufgrund der hohen Strahlenbelastung des Verfahrens und des aktuell noch begrenzten Probenvolumens wären zunächst nur Untersuchungen am Kleintier umsetzbar.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Darstellung größerer Knochenwachstumsbereiche mittels konventioneller Auflichtfluoreszenzmikroskopie anzustreben. Seit Einführung digitaler Kameras zur Bildakquisition und einer computergestützten Auswertung kann durch dünnere Schnitte eine Reduktion der Überlagerung der Fluorochrome erzielt werden. In einer Übersichtsarbeit beschreibt van Gaalen, wie durch einen günstigen Arbeitsablauf, bei dem die ungefärbten Schnitte zunächst fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden und erst im Anschluss die histologische Färbung durchgeführt wird, die Darstellung der gleichen Region in hoher Qualität möglich ist [van Gaalen 2010]. Die Proben dieser Untersuchung wurden zudem noch vor der histologischen Aufbereitung per μ CT einer multimodalen Darstellung der Defektregion und der Knochenneubildung hinsichtlich Mikroarchitektur, Knochenwachstumsaktivität und Zellmorphologie zugeführt [Bissinger 2011, Stöhrer 2008]. Nach wie vor existiert kein standardisiertes Schema zur Markierung und Auswertung einer polychromen Sequenzmarkierung, die eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien ermöglichen würde. Ein von van Gaalen propagiertes polychromes Sequenzmarkierungsschema zur konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Auswertung basiert auf den Fluorochromen Oxytetracyclin, Calzein Grün, Alizarin Rot und Xylenolorange. Hier könnte kritisch angemerkt werden, dass die Kombination von Alizarin Rot mit einem Emissionsspektrum von 600-645 nm und Xylenolorange mit einem Emissionsspektrum von 610-615 nm eine nicht notwendige Erschwernis in der optischen Auswertung darstellen [Pautke 2005, van Gaalen 2010]. Daher wäre die Verwendung von Calcein Blau, welches sich optisch deutlich von den drei anderen Farbtönen abhebt, gemäß den hier vorliegenden Ergebnissen eine sinnvolle Alternative und wird so auch bereits vielversprechend in Folgeversuchen eingesetzt.

Für den Hauptversuch wurde das Markierungsschema von den ursprünglich sechs ausgewählten Fluorochromen auf vier Fluorochrome reduziert. Dies war nötig, da ein Beobachtungszeitraum von lediglich vier Wochen gewählt wurde. BAPTA konnte aufgrund der o.g. Gründe nicht genutzt werden. Des Weiteren wurde auf die Verwendung von Rolitetracycline verzichtet. Auch wenn es nur geringen Anhalt für einen negativen Einfluss von Tetracyclin auf die Knochenheilung gibt [Engesaeter 1978], so stellt diese Gruppe

doch die einzige therapeutisch wirksame Substanz dar. Die Einmalgabe eines dieser Antibiotika in einer suprathérapeutischen Dosierung von 25mg/kg KG könnte daher als Nebenwirkung einen positiven lokalen Einfluss auf die Wundheilung ausüben und wurde daher für die Markierung nicht verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem CLSM die Auswertung einer intravitalem polychromen Sequenzmarkierung mit fünf Fluorochromen möglich ist. Dabei handelt es sich allerdings um ein technisches, zeitlich und finanziell sehr anspruchsvolles Verfahren, bei dem die sehr kleine ROI einen limitierenden Faktor darstellt. Die CLSM sollte daher der Darstellung von Knochenwachstum und Knochenaktivität ohne Anwendung der Immunfluoreszenz, für Spezialuntersuchungen z.B. im Bereich des direkten Knochen-Implantat-Interfaces vorbehalten bleiben.

5.2 Diskussion der Ergebnisse des in vivo Versuchs

Im Rahmen des Tierversuchs sollten die Übertragung eines in vitro geprüften Transfektionssystems zum non-viralen Gentransfer von BMP-2-Plasmid hinsichtlich seiner Wirkung auf die Knochenbildung am critical-size-defect des Rattenunterkiefers überprüft werden [Kolk 2007]. Neben der hier beschriebenen Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung wurden die Proben klinisch, radiologisch, histomorphometrisch [Stöhrer 2008] und mittels μ CT [Bissinger 2011] untersucht. Übergeordnetes Ziel war es zu klären, ob äquivalent zur Applikation von rhBMP-2 auch bei der Applikation von BMP-2-Plasmid eine positive Dosis-Wirkung-Beziehung auf die Knochenwachstumsaktivität zu beobachten ist, die als Nachweis einer Förderung der Osteoinduktion gewertet werden kann.

Die osteoinduktiven Eigenschaften von bone morphogenetic proteins sind seit der Entdeckung dieser Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie bekannt [Rosen 1992, Van de Putte 1965]. Insbesondere BMP-2 zeigte gegenüber den anderen Wachstumsfaktoren das größte osteoinduktive Potential [Kandziora 2002c]. Daher wurde dieser Subtyp für diese Untersuchung ausgewählt. Bone morphogenetic proteins liegen im Knochen nur in geringsten Mengen vor [Kübler 1997], so dass erst mit dem Aufkommen von rekombinantem human BMP-2 eine tierexperimentelle Erforschung der Wirkung und der Einsatzmöglichkeiten möglich wurde. Das osteoinduktive Potential von rhBMP-2 entsprach dem des originären BMP-2 [Wang 1990, Zhao 2002]. Ein positiver Einfluss auf die Frakturheilung wurde in mehreren Studien bestätigt. [Boden 1998, Garrison 2010, Govender 2002, Kubler 1998]. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Knochenneubildung steht in direktem Zusammenhang mit der Menge des eingebrachten rhBMP-2 [Kübler 1997, Riley 1996]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von rhBMP-2 Einfluss auf die frühen Phasen der Knochenheilung nimmt und eine beschleunigte Kallusbildung und -reifung erzielt werden konnte [Kandziora 2002b, Murakami 2002, Zellin 1997b, 1997c]. Aufgrund der zahlreichen Studien zur Wirkung von rhBMP-2 konnte die direkte Applikation des Wachstumsfaktors bei identischem Trägersystem als Referenz für die Untersuchungen zur Wirkung des BMP-2-Plasmids herangezogen werden. Im Rahmen dieses Versuches wurde das rekombinante, kommerziell erhältliche rhBMP-2 (Induct Os[®]) (Fa. Wyeth, Münster, Deutschland) verwendet.

Der critical-size-defect des Rattenunterkiefers stellt dabei ein etabliertes Model zur Untersuchung der Defektheilung dar [Hedner 1995, Schmitz 1986]. Durch die Lage außer-

halb des Trajektoriensystems des Unterkiefers erfolgt nur eine geringe belastungsabhängige Stimulation der Knochenneubildung [Lanyon 1992]. Die Ummantelung des Defektes durch die Weichgewebe der Masseter-Pterygoid-Schlinge führte zu einer hohen Lagestabilität des Titanimplantates. Auch eine Einblutung über den Defektbereich hinaus, sowie eine vermeintliche Diffusion des WF bzw. des BMP-2-Plasmides in die umgebenden Weichgewebe konnte minimiert werden. Allerdings scheint die enge Lagebeziehung des anterioren Defektareals zur Wurzel des Unterkieferschneidezahns einen Einfluss auf die Knochenneubildung zu besitzen. So zeigte sich in dieser Region im μ CT ein größeres Knochenvolumen, welches auch radiologisch und histomorphometrisch bestätigt werden konnte. Ursache hierfür könnte eine höhere Anzahl an Zielzellen im Bereich der Spongiosa und der parodontalen Ligamente sein, die vermehrt BMP-2 Rezeptoren aufweisen [Bissinger 2011, Dereka 2006, Stöhrer 2008]. Die Ratte ist als Tiermodell zur Untersuchung der Knochenheilung gut geeignet. Durch den gegenüber dem Menschen deutlich erhöhten Knochenstoffwechsel zeigen sich sowohl Störungen, als auch eine Promotion der Knochenheilung in einem kürzen Zeitintervall. Selbstverständlich wäre die Etablierung eines vergleichbaren Großtiermodells wünschenswert, allerdings ist hinsichtlich Fallzahl, Handhabung und Kosten das Kleintiermodell zu bevorzugen.

Aufgrund der hohen Kosten, der kurzen Wirkungszeit und der Gefahr einer nicht-regulierbaren Knochenneubildung wird rhBMP-2 nur in ausgewählten Fällen am Menschen eingesetzt. Hierbei stehen die Therapie der verzögerten Knochenheilung bei offenen Frakturen der langen Röhrenknochen und Anwendungen in der Wirbelsäulen Chirurgie im Vordergrund [De Biase 2005, Schmidmaier 2008, Valdes 2009].

Die Gentherapie stellt eine attraktive Alternative zur direkten Applikation von Wachstumsfaktoren dar. Allerdings besteht bei dieser Anwendungsform die Gefahr, dass die eingebrachten Vektoren sich systemisch verteilen und dauerhaft in der Wirts-DNA eingebaut werden könnten [Evans 2010]. Hierbei könnte es im Sinne einer Insertionsmutagenese zu einer Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumor-Suppressorgen kommen [Dincer 2005] Diese Gefahr liegt insbesondere beim viralen Gentransfer vor und kann durch die Verwendung eines non-viralen Carrier-Systems nach dem aktuellen Wissensstand nahezu ausgeschlossen werden [Han 2000, Park 2006]. Für die Gruppe der BMPs kann dieses Risiko exemplarisch anhand des klinischen Bildes einer Fibrodysplasia ossificans progressiva veranschaulicht werden. Hierbei kommt es, wahrscheinlich durch eine heterozygote missense Mutation am ACVR1/ALK2 BMP Typ I Re-

zeptor, zu einer Aktivierung des BMP Signals in Abwesenheit von BMP und zu einer Dysregulation von BMP im Extrazellularraum. Neben Wachstumsstörungen kommt es bei betroffenen Patienten zu einer Trauma- oder Infektionsgetriggerten heterotropen enchondralen Ossifikation mit ektopter Skeletogenese. Die Lebenserwartung der Betroffenen liegt, limitiert durch Folgen der Verknöcherung des Thorax, im fünften Lebensjahrzehnt [Kaplan 2009].

Bei der hier vorgestellten Untersuchung wurde eine genaktivierte Matrixbeschichtung auf einer Titanoberfläche eingesetzt. Die Applikation des Plasmid-Carrier-Systems auf einer Titanbasis ist nicht nur wegen der ausgezeichneten Biokompatibilität des Werkstoffs zu bevorzugen, sondern stellt auch eine direkte Vorstufe zur klinischen Anwendung des Systems auf Osteosynthesematerialien oder dentalen Implantaten dar [Becker 2006]. Die Auflagerung eines flächigen Titantransplantates auf einem critical-size-defect ist dabei eine operative Situation, wie sie in nicht-lasttragenden Regionen wie an der Schädelkalotte oder im Bereich der Kieferhöhlenwände zur Verwendung kommen könnte. Die Frage, ob das verwendete Träger-Matrix-Plasmid System der mechanischen Belastung auf einer Implantatoberfläche z.B. bei der enoralen enossalen Implantation widersteht, ist Gegenstand weiterer Forschung.

Das verwendete Plasmid-Carrier System wurde hinsichtlich seiner Transfektion und Expression in vitro getestet. [Honig 2010, Kolk 2007]. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängig Expression von BMP-2-mRNA. Zur Bestätigung dieser Dosis-Wirkungs-Beziehung in vivo wurde die Knochenwachstumsaktivität im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierzu wurde die Knochenwachstumsaktivität an vier definierten Zeitpunkten durch Fluoreszenzmarkierung dargestellt. Vom Zeitpunkt der Markierung wurde der neu gebildete Knochen über einen Zeitraum von etwa 24-36 Stunden angefärbt [van Gaalen 2010]. Durch einen Abstand von 7 Tagen zwischen den Markierungen konnte davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Doppelmarkierung der Knochensubstanz kam. Auch etwaige Unterschiede im Färbeverhalten der verschiedenen Fluorochrome konnten keinen Einfluss auf das Ergebnis ausüben, da jeder Zeitpunkt bei jedem Tier mit demselben Fluorochrom angefärbt wurde. Es ist bei dieser Untersuchung darauf hinzuweisen, dass es sich um Verhältniszahlen handelt, die keine Aussage bezüglich der Qualität und Quantität des gebildeten Knochens machen.

Bei den Tieren der rhBMP-2 Gruppe zeigte sich eine in die frühe Phase der Frakturheilung verschobenen Osteoinduktion. Bereits am Tag 6 war eine Kalzifizierung in 15,1%

der bis zum 27. Tag gebildeten Knochenmatrix nachweisbar und auch zum Untersuchungszeitpunkt an Tag 13 zeigte sich sowohl im direkten Vergleich als auch schlussfolgernd in der kumulativen Darstellung eine fortgeschrittene Kalzifizierung von insgesamt 37,0%. Dieser Effekt des rhBMP-2 wurde grundsätzlich bereits in multiplen Voruntersuchen beschrieben [Cochran 1999, Kandziora 2002b, Lieberman 2002, Murakami 2002, Zellin 1997a, 1997b]. Als starker Promotor der Osteoinduktion wurde daher diese Gruppe als Referenzgruppe definiert. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Wirkung verschiedener BMP-2-Plasmid Konzentrationen im Vergleich zu rhBMP-2 und somit konnte auf fluoreszenzmikroskopische Auswertung einer Nativ-Kontrolle verzichtet werden. Die folgende Abbildung (Abb. 5-1) stellt die Basisformen der Knochenwachstumsaktivität dar wie sie in der Untersuchung ausgewertet wurden. Dabei wurde einmal die Darstellung in prozentualen Einzelwerten (links) und einmal in prozentualen Kumulativwerten (rechts) gewählt.

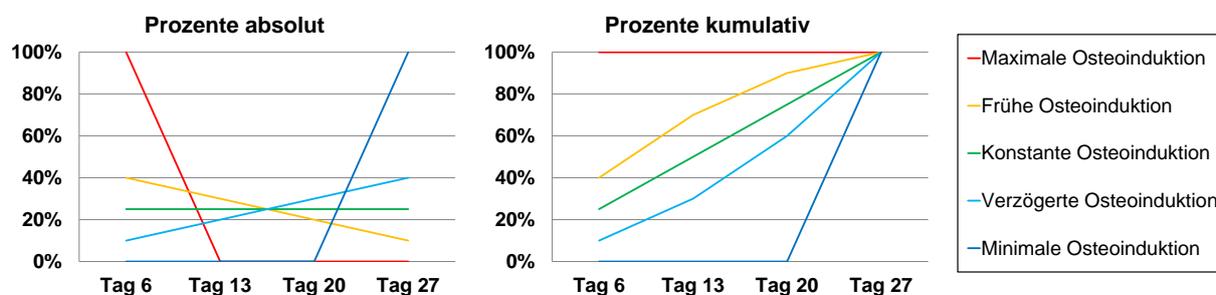


Abb. 5-1 Basisformen der Knochenwachstumsaktivität bei verschiedenen Abläufen der Osteoinduktion im Rahmen dieser Versuchsanordnung

Bei einer starken osteoinduktiven Potenz wäre in diesem Versuchsaufbau eine starke Fluoreszenzmarkierung an den frühen Untersuchungszeitpunkten zu erwarten gewesen (rote Kurve) die dann abflacht. Ob es sich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten um eine Suppression der Knochenneubildung oder um das Erreichen eines Endzustandes handelt ist aus dieser Untersuchung nicht ableitbar. Bei einer aktiven Verlagerung der Osteoinduktion in die frühe Phase der Knochenheilung wäre ein langsam abfallender Kurvenverlauf (orange Kurve) zu erwarten gewesen. Hierbei würde die Kalzifizierung der Knochenmatrix früh einsetzen um dann im Verlauf langsamer fortzuschreiten. Auch eine homogene Verteilung der Knochenwachstumsaktivität wäre theoretisch möglich (grüne Kurve). Die obengenannten Kurvenverläufe stellen allesamt eine Knochenwachstumsaktivität dar die sich maßgeblich von der physiologischen Knochenneubildung unterscheidet. Auch eine extreme Verzögerung der Osteoinduktion (dunkelblaue Kurve) wäre am ehesten mit einer aktiven Suppression der an der Knochenneubildung beteiligten Zellen zu erklären. Dementsprechend sind sowohl für das physiologische Knochenwachstum

als auch unter dem Einfluss von rhBMP-2 und BMP-2-Plasmid Variationen einer verzögerten Osteoinduktion (hellblaue Kurve) zu erwarten.

Eine Abflachung der Kurve in Richtung einer konstanten Osteoinduktion durch Erhöhung der initialen Knochenwachstumsaktivität an Tag 6 entspricht daher dem gewünschten Effekt, welcher bei rhBMP-2 zu erwarten ist und der in dieser Untersuchung für das BMP-2-Plasmid gezeigt werden sollte. Die favorisierte Konzentration von rhBMP-2 war 62,5µg und für das BMP-2-Plasmids 2,5µg. Diese Werte hatte sich aus den in vitro Vorversuchen ergeben [Kolk 2007]

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung zeichneten sich zwei Gruppen ab. Die Tiere, deren Implantate mit 2,5µg, 12,5µg und 25µg BMP-2-Plasmid beschichtet waren, zeigten im zeitlichen Verlauf eine ähnliche Knochenwachstumsaktivität wie die rhBMP-2 Tiere. Dabei waren zum ersten Untersuchungszeitpunkt 10-15% des untersuchten Knochenzuwachses erfolgt. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt an Tag 14 zeigte rhBMP-2 mit 19% eine leichte Steigerung der Knochenwachstumsaktivität gegenüber Tag 6 und dementsprechend auch gegenüber anderen o.g. Gruppen. Diese zeigten an Tag 13 einen Abfall der Knochenwachstumsaktivität auf 11-12%. Eine mögliche Erklärung ist der Einfluss der körpereigenen Regulationsmechanismen auf die Expression und Proteinsynthese, welche bei der Applikation des rhBMP-2 Proteins keinen supprimierenden Einfluss ausüben können. Demgegenüber zeigten die Tiere, deren Implantate mit 50µg und 100µg BMP-2-Plasmid beschichtet waren gegenüber allen anderen Gruppen am Tag 6 eine verzögerte Knochenwachstumsaktivität. Diese war bei der 50µg Gruppe noch deutlicher ausgeprägt als bei den 100µg Tieren. Dies könnte mit einer Untersuchung von Sciadini und Johnson in Einklang gebracht werden. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ein critical-size-defect am Hundemodell mit einem mit verschiedenen Konzentrationen von rhBMP-2 überzogenen Kollagenimplantat überbrückt. Das Implantat mit der geringsten Dosierung von 150µg rhBMP-2 zeigte dabei die besten biomechanischen Eigenschaften und die geringste Ausbildung von zystenartigen Knochenporen [Sciadini 2000]. Diese Beobachtung legt nahe, dass es unter dem Einfluss einer zu hohen Konzentration von BMP-2-Plasmid zu einer Hemmung der Ausbildung von kalzifizierenden Strukturen im Rahmen der Osteoinduktion kommen kann.

Bereits an Tag 13 zeigte sich in der kumulativen Darstellung eine ähnliche Gesamtknochenwachstumsaktivität der Gruppen rhBMP-2, BMP-2-Plasmid 2,5µg, BMP-2-Plasmid, 50µg und BMP-2-Plasmid 100 zwischen 30% und 37%. Diese Entwicklung ist mit

einer verzögerten Osteoinduktion der 50 μ g und 100 μ g BMP-2-Plasmid Gruppen zu begründen. Je länger sich der Zeitpunkt bis zum Einsetzen von Knochenwachstumsaktivität verzögert, desto stärker tritt dieser Ausgleich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten zu Tage um eine Gesamtknochenwachstumsaktivität von 100% an Tag 27 zu erreichen (Abb. 5-1). Wenn man daher die Wertigkeit der Knochenwachstumsaktivität auf die ersten beiden Untersuchungszeitpunkte konzentriert, zeigt sich die 2,5 μ g Gruppe als diejenige mit dem günstigsten Verlauf. Die Beobachtung, dass es bei dieser Gruppe am Tag 20 zu einem Abfall der kumulativen Wachstumsaktivität kommt, entspricht dem zu erwartenden Verhalten bei der frühen Osteoinduktion.

Zu beachten ist, dass bei der Applikation von Wachstumsfaktoren auf Trägersystemen auf einem PDLLA Trägersystem bereits in den ersten 48 Stunden 50% des rhBMP-2 freigesetzt wird [Schmidmaier 2001b]. Dies entspricht der Forderung, dass eine Verlängerung der Wirkdauer durch ein Trägersystem mit langsamer Freisetzungskinetik der BMP Moleküle erreicht wird [Takahashi 2005]. Eine derartige Verlängerung und auch Verzögerung der Wirkdauer könnte sich damit positiv auf die Osteoinduktion auswirken, da der Effekt der Verzögerung der Knochenwachstumsaktivität durch zu hohe Konzentrationen von rhBMP-2 und BMP-2-Plasmid durch eine langsame Freisetzungskinetik reduziert werden könnte. Es besteht die Möglichkeit, dass dadurch körpereigene Regulationsmechanismen eine günstigere Wirkung und Verteilung des vorhandenen BMP-2 bewirken können. Trotzdem sollten aufgrund der kurzen Halbwertszeit des zur Verfügung stehenden BMP-2 die Ergebnisse der späteren Untersuchungszeitpunkte an Tag 20 und Tag 27 nicht überinterpretiert werden, sondern als Konsequenz des Einflusses auf die frühe Knochenwachstumsaktivität eingestuft werden.

Der Langzeiteffekt wurde mittels μ CT [Bissinger 2011] sowie klinisch, radiologisch und histomorphometrisch beschrieben [Stöhrer 2008]. In der Auswertung mittels μ CT konnte dabei für die BMP-2-Plasmid Gruppen mit 2,5 μ g, 12,5 μ g und 25 μ g signifikant mehr Knochenvolumen nachgewiesen werden als in den BMP-2-Plasmid Gruppen mit 50 μ g und 100 μ g, allerdings ohne eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dies ist mit den Beobachtungen der Knochenwachstumsaktivität gut vereinbar, wenn man eine frühe Förderung der Osteoinduktion als Basis für eine erfolgreiche Knochenheilung wertet.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem hier zur Anwendung kommenden Transfektionssystem zum non-viralen Gentransfer von BMP-2-Plasmid Einfluss auf die Knochenwachstumsaktivität am critical-size-defect des Rattenunterkiefers genommen werden konnte. Gegenüber der Vergleichsgruppe mit einer Beschichtung von 62,5 μ g rhBMP-2

konnte eine Beschichtung mit 2,5µg BMP-2-Plasmid einen vergleichbaren, wenn auch nicht ganz so starken positiven Effekt, im Sinn einer frühen Osteoinduktion, auf die Knochenwachstumsaktivität hervorrufen. Es zeigte sich, dass ein Trägersystem mit hohen Dosierungen von 50µg und 100µg BMP-2-Plasmid initial zu einer Hemmung der Knochenwachstumsaktivität in der ersten Woche führte die in der Folge kompensiert wird. Die Untersuchung legt nahe, dass analog zu den ex vivo Vorversuchen [Kolk 2007] auch in vivo das verwendete Transfektionssystem mit einer Konzentration von 2,5µg BMP-2-Plasmid durch eine Erhöhung der Knochenwachstumsaktivität in der frühen Phase der Knochenheilung einen günstigen Einfluss auf die Osteoinduktion hat.

6 Zusammenfassung

Die Fortschritte in der Medizin und die demographische Entwicklung erhöhen die Anforderungen an die Knochenheilung. Zum einen werden mehr ältere und multimorbide Patienten mit einer kompromittierten Knochenheilung der operativ-osteosynthetischen Frakturversorgung zugeführt, zum anderen kommt es durch die weite Verbreitung der intra- und extraoralen Implantologie zu erhöhten Anforderungen an das Knochenlager und ein stabiles Knochen-Implantat-Interface wird als Behandlungsziel erwartet.

Eine deutliche Verbesserung der Knochenheilung kann durch das rekombinante humane bone-morphogenetic-protein 2 (rhBMP-2) erzielt werden. Dieser körpereigene Wachstumsfaktor führt zu einer Steigerung der Osteoinduktion. Die direkte Applikation von rhBMP-2 ist sehr kostenintensiv. Eine Alternative stellt der Gentransfer dar. Hierbei wird das BMP-2-Plasmid am Wirkort platziert und der Wachstumsfaktor vom Körper selbst synthetisiert. Es besteht die Möglichkeit des viralen und non-viralen Gentransfers. Beim viralen Gentransfer kann das Risiko einer dauerhaften Veränderung des Genoms nicht gänzlich ausgeschlossen werden, beim non-viralen Gentransfer steht die Problematik einer geringen Transfektionsrate im Vordergrund.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode mit einem non-viralen Gentransfer von BMP-2-Plasmid hinsichtlich des Einflusses verschiedener Konzentrationen auf die Knochenwachstumsaktivität getestet. Dabei kamen Titanplättchen zum Einsatz auf denen in einer PDLLA Matrix in COPROGs kondensiertes und geschütztes, BMP-2-Plasmid in Konzentrationen von 2,5µg, 12,5µg, 25µg, 50µg und 100µg auf einen critical-size-defect am Rattenunterkiefer platziert wurde. Bei der Referenzgruppe wurden anstelle des BMP-2-Plasmids 62,5µg rhBMP-2 auf dem Defektbereich platziert. Für die Auswertung der durchgeführten vierfach polychromen Sequenzmarkierung an den Tagen 6, 13, 20 und 27 wurde erstmalig die Verwendung eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskop beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass unter einem erheblichen apparativen und zeitlichen Aufwand die Auswertung einer komplexen polychromen Sequenzmarkierung mit fünf Fluorochromen mittels CLSM möglich ist. Limitierend ist dabei vor allem die geringe Größe der region of interest. Dies macht dieses Verfahren zur Beobachtung großer Gruppen und großer Defekte unattraktiv. Die Technik sollte in erster Linie der Darstellung von Knochenwachstum und Knochenaktivität ohne Anwendung der Immunfluoreszenz für Spezi-

aluntersuchungen, z.B. im Bereich des direkten Knochen-Implantat-Interface, vorbehalten bleiben. Die Kombination der CLSM mit einer polychromen Sequenzmarkierung ist sinnvoll. In Zukunft könnten in vivo μ -CT Untersuchungen eine Alternative darstellen, allerdings bei deutlich höheren Versuchskosten.

Hinsichtlich des Einflusses auf die Knochenwachstumsaktivität zu den beobachteten Zeitpunkten kam es bei den Tieren mit einer 2,5 μ g BMP-2-Plasmid Beschichtung gegenüber der rhBMP-2 Referenzgruppe zu einer in Näherung gleichen Verteilung. Es zeigte sich, dass ein Trägersystem mit hohen Dosierungen von 50 μ g und 100 μ g BMP-2-Plasmid initial zu einer Hemmung der Knochenwachstumsaktivität in der ersten Woche führte. Insbesondere die gewonnenen Daten zu den Untersuchungszeitpunkten an Tag 21 und Tag 27 müssen aufgrund der kurzen Halbwertszeit sowohl des rhBMP-2 als auch des BMP-2-Plasmids zurückhaltend beurteilt werden.

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. Abu-Id, M.H., Acil, Y., Gottschalk, J., Kreuzsch, T. [Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10 (2006) 73-81
4. Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A.M., Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The journal of gene medicine* 7 (2005) 657-663
5. Akizuki, S., Yasukawa, Y., Takizawa, T. A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty. *Bulletin (Hospital for Joint Diseases (New York, N.Y* 56 (1997) 222-224
6. Albrektsson, T., Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2 (2001) S96-101
7. 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
8. Armstrong, W.G., Horsley, H.J. Isolation of fluorescent components from ox-bone human dentine and gelatin. *Nature* 211 (1966) 981
9. Aschoff, H.H., Clausen, A., Hoffmeister, T. [The endo-exo femur prosthesis--a new concept of bone-guided, prosthetic rehabilitation following above-knee amputation]. *Z Orthop Unfall* 147 (2009) 610-615
10. Aspenberg, P., Lohmander, L.S. Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats. *Acta orthopaedica Scandinavica* 60 (1989) 473-476
11. Bachman, C.H., Ellis, E.H. Fluorescence of bone. *Nature* 206 (1965) 1328-1331
12. Bak, M., Jacobson, A.S., Buchbinder, D., Urken, M.L. Contemporary reconstruction of the mandible. *Oral Oncol* 46 (2010) 71-76
13. Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14 (1999) 1805-1815
14. Baschong, W., Suetterlin, R., Hefti, A., Schiel, H. Confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy of tissue Ti-implant interfaces. *Micron* 32 (2001a) 33-41
15. Baschong, W., Suetterlin, R., Laeng, R.H. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem* 49 (2001b) 1565-1572
16. Bateli, M., Att, W., Strub, J.R. Implant neck configurations for preservation of marginal bone level: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 26 (2011) 290-303

17. Bax, B.E., Wozney, J.M., Ashhurst, D.E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 65 (1999) 83-89
18. Becker, J., Kirsch, A., Schwarz, F., Chatzinikolaidou, M., Rothamel, D., Lekovic, V., Laub, M., Jennissen, H.P. Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clinical oral investigations* 10 (2006) 217-224
19. Billings, P.C., Fiori, J.L., Bentwood, J.L., O'Connell, M.P., Jiao, X., Nussbaum, B., Caron, R.J., Shore, E.M., Kaplan, F.S. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Res* 23 (2008) 305-313
20. Bishop, G.B., Einhorn, T.A. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop* 31 (2007) 721-727
21. Bissinger, O. (2011) Bildgebende Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation von rhBMP-2 versus Nukleinsäuretransfer am Rattenunterkiefer. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar. Technische Universität München Munich
22. Boden, S.D., Titus, L., Hair, G., Liu, Y., Viggewarapu, M., Nanes, M.S., Baranowski, C. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1). *Spine* 23 (1998) 2486-2492
23. Boss, J.H. Osseointegration. *Journal of long-term effects of medical implants* 9 (1999) 1-10
24. Bostrom, M.P., Asnis, P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1998 Oct;(355 Suppl):S66-72 (1998) S124-131
25. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 7297-7301
26. Bouxsein, M.L., Kaufman, J., Tosi, L., Cummings, S., Lane, J., Johnell, O. Recommendations for optimal care of the fragility fracture patient to reduce the risk of future fracture. *J Am Acad Orthop Surg* 12 (2004) 385-395
27. Boyde, A. Stereoscopic images in confocal (tandem scanning) microscopy. *Science (New York, N.Y)* 230 (1985) 1270-1272
28. Branemark, P.I. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50 (1983a) 399-410
29. Branemark, P.I., Adell, R., Albrektsson, T., Lekholm, U., Lundkvist, S., Rockler, B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials* 4 (1983b) 25-28
30. Branemark, P.I., Albrektsson, T. Titanium implants permanently penetrating human skin. *Scand J Plast Reconstr Surg* 16 (1982) 17-21
31. Branemark, R., Branemark, P.I., Rydevik, B., Myers, R.R. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. *J Rehabil Res Dev* 38 (2001) 175-181
32. Brisson, M., Huang, L. Liposomes: conquering the nuclear barrier. *Current opinion in molecular therapeutics* 1 (1999) 140-146

33. Brown, B.D., Lillicrap, D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 100 (2002) 1133-1140
34. Brown, J.S., Shaw, R.J. Reconstruction of the maxilla and midface: introducing a new classification. *Lancet Oncol* 11 (2010) 1001-1008
35. Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M., Wagner, E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene therapy* 7 (2000) 401-407
36. Brunski, J.B. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Advances in dental research* 13 (1999) 99-119
37. Burghardt, A.J., Link, T.M., Majumdar, S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res* 469 (2011) 2179-2193
38. Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C., Tagliabue, L. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury* 42 (2011) 587-590
39. Cameron, H.U., Pilliar, R.M., MacNab, I. The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998 Mar 15;39(4):611-20 7 (1973) 301-311
40. Cannon, C.P., Lin, P.P., Lewis, V.O., Yasko, A.W. Management of radiation-associated fractures. *J Am Acad Orthop Surg* 16 (2008) 541-549
41. Carofino, B.C., Lieberman, J.R. Gene therapy applications for fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1 (2008) 99-110
42. Chen, D., Ji, X., Harris, M.A., Feng, J.Q., Karsenty, G., Celeste, A.J., Rosen, V., Mundy, G.R., Harris, S.E. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142 (1998) 295-305
43. Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22 (2004) 233-241
44. Chiu, Y.T., Liao, Y.F. Is Cleft Severity Related to Maxillary Growth in Patients with Unilateral Cleft Lip and Palate? *Cleft Palate Craniofac J* (2010)
45. Christiansen, J.H., Coles, E.G., Wilkinson, D.G. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 719-724
46. Chung, D.M., Oh, T.J., Shotwell, J.L., Misch, C.E., Wang, H.L. Significance of keratinized mucosa in maintenance of dental implants with different surfaces. *Journal of periodontology* 77 (2006) 1410-1420
47. Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., Warwick, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim* 30 (1996) 293-316
48. Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E.M., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., Warwick, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab Anim* 31 (1997) 1-32
49. Co, D.O., Borowski, A.H., Leung, J.D., van der Kaa, J., Hengst, S., Platenburg, G.J., Pieper, F.R., Perez, C.F., Jirik, F.R., Drayer, J.I. Generation of transgenic

- mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection. *Chromosome Res* 8 (2000) 183-191
50. Cochran, D.L., Schenk, R., Buser, D., Wozney, J.M., Jones, A.A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *Journal of periodontology* 70 (1999) 139-150
 51. Cooke, H. Mammalian artificial chromosomes as vectors: progress and prospects. *Cloning and stem cells* 3 (2001) 243-249
 52. Davies, J.E. In vitro modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical record* 245 (1996) 426-445
 53. Davies, J.E. Mechanisms of endosseous integration. *The International journal of prosthodontics* 11 (1998) 391-401
 54. De Biase, P., Capanna, R. Clinical applications of BMPs. *Injury* 36 Suppl 3 (2005) S43-46
 55. Deppe, H., Horch, H.H., Kolk, A. Microstructured dental implants and palatal mucosal grafts in cleft patients: a retrospective analysis. *J Cranio Maxill Surg* 32 (2004a) 211-215
 56. Deppe, H., Horch, H.H., Neff, A. Conventional versus CO₂ laser-assisted treatment of peri-implant defects with the concomitant use of pure-phase beta-tricalcium phosphate: a 5-year clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 22 (2007) 79-86
 57. Deppe, H., Stemberger, A. Effects of laser-modified versus osteopromotively coated titanium membranes on bone healing: a pilot study in rat mandibular defects. 18 (2004b)
 58. 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 (2003a) 369-376
 59. Deppe, H., Stemberger, A., Hillemanns, M. Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects. 18 (2003b) 369-376
 60. Dereka, X.E., Markopoulou, C.E., Vrotsos, I.A. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors* 24 (2006) 260-267
 61. Dillon, N. Regulating Gene-Expression in Gene-Therapy. *Trends Biotechnol* 11 (1993) 167-173
 62. Dincer, S., Turk, M., Piskin, E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene therapy* 12 Suppl 1 (2005) S139-145
 63. Donath, K., Breuner, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11 (1982) 318-326
 64. Dragoo, J.L., Choi, J.Y., Lieberman, J.R., Huang, J., Zuk, P.A., Zhang, J., Hedrick, M.H., Benhaim, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. 21 (2003) 622-629
 65. Einhorn, T.A. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 77 (1995) 940-956
 66. Einhorn, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* (1998) S7-21

67. Eliyahu, H., Barenholz, Y., Domb, A.J. Polymers for DNA delivery. *Molecules* 10 (2005) 34-64
68. Engesaeter, L.B., Skar, A.G. Effects of oxytetracycline on the mechanical properties of bone and skin in young rats. *Acta orthopaedica Scandinavica* 49 (1978) 529-534
69. Evans, C. Gene therapy for the regeneration of bone. *Injury* (2011)
70. Evans, C.H. Gene therapy for bone healing. *Expert Rev Mol Med* 12 (2010) e18
71. Evans, C.H., Ghivizzani, S.C., Robbins, P.D. Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Res Ther* 10 (2008) 110
72. Ferretti, J.L., Cointry, G.R., Capozza, R.F., Frost, H.M. Bone mass, bone strength, muscle-bone interactions, osteopenias and osteoporoses. *Mech Ageing Dev* 124 (2003) 269-279
73. 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 therapy* 7 (2000) 1183-1192
74. Freeman, L. The Application of Extension to Overlapping Fractures, Especially of the Tibia, by Means of Bone Screws and a Turnbuckle, without Open Operation. *Ann Surg* 70 (1919) 231-235
75. Frost, H.M. Tetracycline bone labeling in anatomy. *Am J Phys Anthropol* 29 (1968) 183-195
76. Frost, H.M. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3 (1969) 211-237
77. Frost, H.M. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner* 2 (1987) 73-85
78. Frost, H.M. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 7 (1992) 253-261
79. Furlong, R.J., Osborn, J.F. Fixation of Hip Prostheses by Hydroxyapatite Ceramic Coatings. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 73 (1991) 741-745
80. Gábor, C., Tobis, S., Justine, K., Oliver, B. (2011) Homepage of the LMC ETH (Zurich, Switzerland) <http://www.lmc.ethz.ch>.
81. Gao, X., Kim, K.S., Liu, D. Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *Aaps J* 9 (2007) E92-104
82. Garrison, K.R., Shemilt, I., Donell, S., Ryder, J.J., Mugford, M., Harvey, I., Song, F., Alt, V. Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev* (2010) CD006950
83. Godbey, W.T., Barry, M.A., Saggau, P., Wu, K.K., Mikos, A.G. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998 Mar 15;39(4):611-20 51 (2000) 321-328
84. Goldberg, V.M., Jinno, T. The bone-implant interface: a dynamic surface. *Journal of long-term effects of medical implants* 9 (1999) 11-21
85. Gondolph-Zink, B. [Effect of hydroxyapatite layering on the osteo-integration of weightbearing and non-weightbearing implants. Comparison to other microporous surfaces in animal experiments]. *Der Orthopade* 27 (1998) 96-104

86. Gorustovich, A.A., Sivak, M.G., Guglielmotti, M.B. A novel methodology for imaging new bone formation around bioceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res A* 81 (2007) 443-445
87. Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M.G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R.L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P.M., Rondia, J., Rossouw, W.C., Daneel, P.J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T.A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R.B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 2123-2134
88. Gutwald, R., Haberstroh, J., Stricker, A., Ruther, E., Otto, F., Xavier, S.P., Oshima, T., Marukawa, E., Seto, I., Enomoto, S., Hoogendijk, C.F., Schmelzeisen, R., Sauerbier, S. Influence of rhBMP-2 on bone formation and osseointegration in different implant systems after sinus-floor elevation. An in vivo study on sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 38 (2010) 571-579
89. Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K., Kim, S.W. Development of biomaterials for gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2 (2000) 302-317
90. Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J.R., Fu, F.H., Huard, J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 84A (2002) 1046-1061
91. Hannallah, D., Peterson, B., Lieberman, J.R., Fu, F.H., Huard, J. Gene therapy in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect* 52 (2003) 753-768
92. Harris, W.H. A microscopic method of determining rates of bone growth. *Nature* 188 (1960) 1038-1039
93. Hattner, R., Frost, H.M. Fluorescence of tetracyclines in bone. Absorption maximum, hydration shell and polarization effects. *J Surg Res* 2 (1962) 262-267
94. Hedner, E., Linde, A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes--an experimental study in rat mandibular defects. *European journal of oral sciences* 103 (1995) 236-241
95. Holgers, K.M., Tjellstrom, A., Bjursten, L.M., Erlandsson, B.E. Soft tissue reactions around percutaneous implants: a clinical study of soft tissue conditions around skin-penetrating titanium implants for bone-anchored hearing aids. *Am J Otol* 9 (1988) 56-59
96. Honig, D., DeRouchey, J., Jungmann, R., Koch, C., Plank, C., Radler, J.O. Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules* 11 (2010) 1802-1809
97. Horch, H.H., Sader, R., Pautke, C., Neff, A., Deppe, H., Kolk, A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 35 (2006) 708-713

98. Huja, S.S., Katona, T.R., Burr, D.B., Garetto, L.P., Roberts, W.E. Microdamage adjacent to endosseous implants. *Bone* 25 (1999) 217-222
99. Ilizarov, G.A. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* (1990) 8-26
100. Isgaard, J., Nilsson, A., Lindahl, A., Jansson, J.O., Isaksson, O.G. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *The American journal of physiology* 250 (1986) E367-372
101. Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A., Wozney, J.M. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13 (1996) 291-300
102. Jones, C.W., Smolinski, D., Keogh, A., Kirk, T.B., Zheng, M.H. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Prog Histochem Cyto* 40 (2005) 1-71
103. Joyce, M.E., Jingushi, S., Bolander, M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *The Orthopedic clinics of North America* 21 (1990) 199-209
104. Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M., Jansen, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research* 20 Suppl 4 (2009) 185-206
105. Kandziora, F., Bail, H., Schmidmaier, G., Schollmeier, G., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Pflugmacher, R., Mittlmeier, T., Raschke, M., Haas, N.P. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 97 (2002a) 40-48
106. Kandziora, F., Bail, H., Schmidmaier, G., Schollmeier, G., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Pflugmacher, R., Mittlmeier, T., Raschke, M., Haas, N.P. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. 97 (2002b) 40-48
107. Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Schollmeier, G., Bail, H., Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M., Haas, N.P. Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF-ss1 application in a sheep cervical spine fusion model. 11 (2002c) 482-493
108. Kaplan, F.S., Pignolo, R.J., Shore, E.M. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2009) 399-407
109. Karakoca, S., Aydin, C., Yilmaz, H., Bal, B.T. Survival rates and periimplant soft tissue evaluation of extraoral implants over a mean follow-up period of three years. *J Prosthet Dent* 100 (2008) 458-464
110. Kawabata, K., Takakura, Y., Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* 12 (1995) 825-830
111. 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. 14 (2003) 1547-1556
112. Kay, M.A., Glorioso, J.C., Naldini, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7 (2001) 33-40

113. Kazama, J.J., Gejyo, F., Ejiri, S., Okada, M., Ei, I., Arakawa, M., Ozawa, H. Application of confocal laser scanning microscopy to the observation of bone biopsy specimens. *Bone* 14 (1993) 885-889
114. Kempen, D.H., Creemers, L.B., Alblas, J., Lu, L., Verbout, A.J., Yaszemski, M.J., Dhert, W.J. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16 (2010) 551-566
115. Kerschnitzki, M., Wagermaier, W., Liu, Y., Roschger, P., Duda, G.N., Fratzl, P. Poorly ordered bone as an endogenous scaffold for the deposition of highly oriented lamellar tissue in rapidly growing ovine bone. *Cells, tissues, organs* 194 (2011) 119-123
116. Kim, S.K., Lee, H.N., Choi, Y.C., Heo, S.J., Lee, C.W., Choie, M.K. Effects of anodized oxidation or turned implants on bone healing after using conventional drilling or trabecular compaction technique: histomorphometric analysis and RFA. *Clinical oral implants research* 17 (2006) 644-650
117. Kimmelman, J. Recent developments in gene transfer: risk and ethics. *Bmj* 330 (2005) 79-82
118. Knoell, D.L., Yiu, I.M. Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials. *Am J Health Syst Pharm* 55 (1998) 899-904
119. Kohara, H., Tabata, Y. Enhancement of ectopic osteoid formation following the dual release of bone morphogenetic protein 2 and Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 from gelatin sponges. *Biomaterials* 32 (2011) 5726-5732
120. Kolk, A. (2007) Förderung des Knochenwachstums durch nicht - viralen BMP-2- Gentransfer aus PDLLA- beschichteten Titanimplantatoberflächen – In Vitro und in Vivo Untersuchungen – im Vergleich zum rekombinanten Protein rh BMP-2. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie. Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München Munich
121. 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
122. Konijn, G.A., Vardaxis, N.J., Boon, M.E., Kok, L.P., Rietveld, D.C., Schut, J.J. 4D confocal microscopy for visualisation of bone remodelling. *Pathology, research and practice* 192 (1996) 566-572
123. Kopatz, I., Remy, J.S., Behr, J.P. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *The journal of gene medicine* 6 (2004) 769-776
124. Kübler, N.R. Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1 (1997) 2-25
125. Kubler, N.R., Reinhart, E., Pistner, H., Bill, J.S., Reuther, J.F. [Clinical application of osteoinductive implants in craniofacial surgery]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2 Suppl 1 (1998) S32-36
126. Laczko, J., Levai, G. Simple Differential Staining Method for Semi-Thin Sections of Ossifying Cartilage and Bone Tissues Embedded in Epoxy-Resin. *Mikroskopie* 31 (1975) 1-4
127. Lam, A.P., Dean, D.A. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene therapy* 17 (2010) 439-447

128. 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
129. Lanyon, L.E. Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res* 7 Suppl 2 (1992) S369-375
130. Ledley, F.D. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Human Gene Therapy* 6 (1995) 1129-1144
131. 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
132. Lind, M. Growth factor stimulation of bone healing - Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation - Abstract. *Acta orthopaedica Scandinavica* 69 (1998) 2-37
133. Linder, L. Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit. *Acta orthopaedica Scandinavica* 60 (1989) 129-134
134. Lindhe, J., Berglundh, T. The interface between the mucosa and the implant. *Periodontol* 2000 17 (1998) 47-54
135. Linkhart, T.A., Mohan, S., Baylink, D.J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19 (1996) 1S-12S
136. Lissenberg-Thunnissen, S.N., de Gorter, D.J., Sier, C.F., Schipper, I.B. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35 (2011) 1271-1280
137. Lopez-Arcas, J.M., Chamorro, M., Del Castillo, J.L., Cebrian, J.L., Palacios, E., Burgueno, M. Osteogenesis imperfecta and orthognathic surgery: case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg* 67 (2009) 1128-1132
138. Luo, D., Saltzman, W.M. Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*. 1998 Mar;16(3):247-52 18 (2000) 33-37
139. Luo, T., Zhang, W., Shi, B., Cheng, X., Zhang, Y. Enhanced bone regeneration around dental implant with bone morphogenetic protein 2 gene and vascular endothelial growth factor protein delivery. *Clinical oral implants research* (2011)
140. Malgaigne, J.F. "Traité des fractures et des luxations" Tome I, Paris, 1847
141. Manurangsee, P., Isariyawut, C., Chatuthong, V., Mekraksawanit, S. Osseointegrated finger prosthesis: An alternative method for finger reconstruction. *J Hand Surg Am* 25 (2000) 86-92
142. Marx, R.E., Garg, A.K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant dentistry* 7 (1998) 267-276
143. 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
144. McKibbin, B. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery* 60-B (1978) 150-162
145. Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., Guy, R.H. Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *J Control Release* 104 (2005a) 203-211

146. Mehier-Humbert, S., Guy, R.H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews* 57 (2005b) 733-753
147. 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
148. Minsky, M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 10 (1988) 128-138
149. Mirtz, T.A., Chandler, J.P., Evers, C.M. The effects of physical activity on the epiphyseal growth plates: a review of the literature on normal physiology and clinical implications. *J Clin Med Res* 3 (2011) 1-7
150. Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996) 12349-12354
151. Mitani, K., Kubo, S. Adenovirus as an integrating vector. *Current gene therapy* 2 (2002) 135-144
152. Mognetti, B., Marino, S., Barberis, A., Martin, A.S., Bala, Y., Di Carlo, F., Boivin, G., Barbos, M.P. Experimental stimulation of bone healing with teriparatide: histomorphometric and microhardness analysis in a mouse model of closed fracture. *Calcif Tissue Int* 89 (2011) 163-171
153. Murakami, N., Saito, N., Horiuchi, H., Okada, T., Nozaki, K., Takaoka, K. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer. *Journal of Biomedical Materials Research* 62 (2002) 169-174
154. Musgrave, D.S., Bosch, P., Ghivizzani, S., Robbins, P.D., Evans, C.H., Huard, J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24 (1999) 541-547
155. Nicolas, V., Prewett, A., Bettica, P., Mohan, S., Finkelman, R.D., Baylink, D.J., Farley, J.R. Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 78 (1994) 1011-1016
156. Nielsen, H.M., Andreassen, T.T., Ledet, T., Oxlund, H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta orthopaedica Scandinavica* 65 (1994) 37-41
157. Niikura, T., Hak, D.J., Reddi, A.H. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res* 24 (2006) 1463-1471
158. Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Dahlstrom, A., Skottner, A., Isaksson, O.G. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science (New York, N.Y)* 233 (1986) 571-574
159. Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Peterson, L., Isaksson, O. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40 (1987) 91-96

160. Novicoff, W.M., Manaswi, A., Hogan, M.V., Brubaker, S.M., Mihalko, W.M., Saleh, K.J. Critical analysis of the evidence for current technologies in bone-healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1 (2008) 85-91
161. Obwegeser, J.A. Maxillary and midface deformities: characteristics and treatment strategies. *Clin Plast Surg* 34 (2007) 519-533
162. Osborn, J.F., Newesley, H. Dynamic aspects of the implant-bone interface. (1980) In: "Dental Implants - Materials and Systems", Heimke G (ed) Carl Hanser München, 1980, vol, pp 111-123
163. Otto, S., Abu-Id, M.H., Fedele, S., Warnke, P.H., Becker, S.T., Kolk, A., Mucke, T., Mast, G., Kohnke, R., Volkmer, E., Haasters, F., Lieger, O., Iizuka, T., Porter, S., Campisi, G., Colella, G., Ploder, O., Neff, A., Wiltfang, J., Ehrenfeld, M., Kreuzsch, T., Wolff, K.D., Sturzenbaum, S.R., Schieker, M., Pautke, C. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: not just a sporadic coincidence - a multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg* 39 (2011) 272-277
164. Park, T.G., Jeong, J.H., Kim, S.W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 58 (2006) 467-486
165. Parkhill, C. A new apparatus for the fixation of bones after resection and in fractures with a tendency to displacement, with report of cases. *Clin Orthop Relat Res* (1897) 3-6
166. Pattani, K.M., Byrne, P., Boahene, K., Richmon, J. What makes a good flap go bad? A critical analysis of the literature of intraoperative factors related to free flap failure. *Laryngoscope* 120 (2010) 717-723
167. Pautke, C., Bauer, F., Tischer, T., Kreutzer, K., Weitz, J., Kesting, M., Holzle, F., Kolk, A., Sturzenbaum, S.R., Wolff, K.D. Fluorescence-guided bone resection in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 67 (2009) 471-476
168. Pautke, C., Vogt, S., Tischer, T., Wexel, G., Deppe, H., Milz, S., Schieker, M., Kolk, A. Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 37 (2005) 441-445
169. Piattelli, A., Trisi, P., Passi, P., Piattelli, M., Cordioli, G.P. Histochemical and confocal laser scanning microscopy study of the bone-titanium interface: an experimental study in rabbits. *Biomaterials* 15 (1994) 194-200
170. Pilolli, G.P., Lucchese, A., Maiorano, E., Favia, G. New approach for static bone histomorphometry: confocal laser scanning microscopy of maxillo-facial normal bone. *Ultrastruct Pathol* 32 (2008) 189-192
171. Pjetursson, B.E., Tan, K., Lang, N.P., Bragger, U., Egger, M., Zwahlen, M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clinical oral implants research* 15 (2004) 667-676
172. Prentice, A.I. Bone autofluorescence and mineral content. *Nature* 206 (1965) 1167
173. Rahn, B. "Die polychrome Sequenzmarkierung Intravitale Zeitmarkierung zur tierexperimentellen Analyse der Knochen- und Dentinbildung" Habilitationsschrift, Freiburg, 1976
174. Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., Batshaw, M.L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine

- transcarbamyrase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80 (2003) 148-158
175. Reddi, A.H. Bone and cartilage differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1994 Oct;4(5):737-44 4 (1994) 737-744
 176. Reddi, A.H. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1998 Oct;(355 Suppl):S66-72 (1998a) S66-72
 177. Reddi, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology*. 1998 Mar;16(3):247-52 16 (1998b) 247-252
 178. Reddi, A.H., Cunningham, N.S. Recent progress in bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins: challenges for biomechanical and tissue engineering. *J Biomech Eng* 113 (1991) 189-190
 179. Riley, E.H., Lane, J.M., Urist, M.R., Lyons, K.M., Lieberman, J.R. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1998 Oct;(355 Suppl):S66-72 (1996) 39-46
 180. Ripamonti, U., Crooks, J., Petit, J.C., Rueger, D.C. Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *European journal of oral sciences* 109 (2001) 241-248
 181. Romanos, G., Froum, S., Hery, C., Cho, S.C., Tarnow, D. Survival rate of immediately vs delayed loaded implants: analysis of the current literature. *J Oral Implantol* 36 (2010) 315-324
 182. Roos-Jansaker, A.M., Lindahl, C., Renvert, H., Renvert, S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 33 (2006) 290-295
 183. Rosen, V., Thies, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8 (1992) 97-102
 184. Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323 (1990) 570-578
 185. Scharschmidt, T.J., Lindsey, J.D., Becker, P.S., Conrad, E.U. Multiple myeloma: diagnosis and orthopaedic implications. *J Am Acad Orthop Surg* 19 (2011) 410-419
 186. Schenk, R.K., Buser, D. Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17 (1998) 22-35
 187. Scherer, F., Schillinger, U., Putz, U., Stemberger, A., Plank, C. Nonviral vector loaded collagen sponges for sustained gene delivery in vitro and in vivo. *The journal of gene medicine* 4 (2002) 634-643
 188. Scheufler, C., Sebald, W., Hulsmeyer, M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of molecular biology* 287 (1999) 103-115
 189. Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A., Plank, C. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res* 25 (2008a) 2946-2962

190. Schillinger, U., Wexel, G., Hacker, C., Kullmer, M., Koch, C., Gerg, M., Vogt, S., Ueblacker, P., Tischer, T., Hensler, D., Wilisch, J., Aigner, J., Walch, A., Stemberger, A., Plank, C. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res* 25 (2008b) 2946-2962
191. Schliephake, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. 31 (2002) 469-484
192. Schmelzeisen, R., Schliephake, H. Interdisciplinary microvascular reconstruction of maxillary, midfacial and skull base defects. *J Craniomaxillofac Surg* 26 (1998) 1-10
193. 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. *Journal of long-term effects of medical implants* 16 (2006) 61-69
194. Schmidmaier, G., Schwabe, P., Strobel, C., Wildemann, B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury* 39 Suppl 2 (2008) S37-43
195. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., Fuchs, T., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N.P., Raschke, M. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28 (2001a) 341-350
196. 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
197. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N.P., Raschke, M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998 Mar 15;39(4):611-20 58 (2001b) 449-455
198. Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (1986) 299-308
199. Sciadini, M.F., Johnson, K.D. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 18 (2000) 289-302
200. Seeherman, H., Wozney, J.M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2005) 329-345
201. Senta, H., Park, H., Bergeron, E., Drevelle, O., Fong, D., Leblanc, E., Cabana, F., Roux, S., Grenier, G., Faucheux, N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2009) 213-222
202. Simon, R.H., Engelhardt, J.F., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Grossman, M., Wilson, J.M. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 4 (1993) 771-780
203. Smith, I.O., Ren, F., Baumann, M.J., Case, E.D. Confocal laser scanning microscopy as a tool for imaging cancellous bone. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 79 (2006) 185-192

204. Steflik, D.E., Corpe, R.S., Lake, F.T., Young, T.R., Sisk, A.L., Parr, G.R., Hanes, P.J., Berkery, D.J. Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998 Mar 15;39(4):611-20 39 (1998) 611-620
205. Stiehler, M., Duch, M., Mygind, T., Li, H., Ulrich-Vinther, M., Modin, C., Baatrup, A., Lind, M., Pedersen, F.S., Bunger, C.E. Optimizing viral and non-viral gene transfer methods for genetic modification of porcine mesenchymal stem cells. *Adv Exp Med Biol* 585 (2006) 31-48
206. Stöhrer, M. (2008) Aktuelle Aspekte der histomorphometrischen und histologischen Beurteilung des Knochenwachstums nach Applikation des rekombinanten Proteins BMP-2 versus Nukleinsäuretransfers – eine tierexperimentelle Studie. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums Rechts der Isar Technischen Universität München Munich
207. Sturge, J., Caley, M.P., Waxman, J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 8 (2011) 357-368
208. Sullivan, J., Uden, M., Robinson, K.P., Sooriakumaran, S. Rehabilitation of the trans-femoral amputee with an osseointegrated prosthesis: the United Kingdom experience. *Prosthet Orthot Int* 27 (2003) 114-120
209. Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Goff, S.P., Weinberg, R.A. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology* 2 (1982) 426-436
210. 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 (2005) 4856-4865
211. Tang, M.X., Szoka, F.C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene therapy* 4 (1997) 823-832
212. Thies, R.S., Bauduy, M., Ashton, B.A., Kurtzberg, L., Wozney, J.M., Rosen, V. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130 (1992) 1318-1324
213. Tovey, S.C., Brighton, P.J., Willars, G.B. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. *Methods Mol Biol* 312 (2005) 57-85
214. Trippel, S.B., Coutts, R.D., Einhorn, T.A., Mundy, G.R., Rosenfeld, R.G. Growth factors as therapeutic agents. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 78A (1996) 1272-1286
215. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, N.Y)* 150 (1965) 893-899
216. Urist, M.R., Strates, B.S. Bone morphogenetic protein. *Journal of dental research* 50 (1971) 1392-1406
217. Valdes, M.A., Thakur, N.A., Namdari, S., Ciombor, D.M., Palumbo, M. Recombinant bone morphogenetic protein-2 in orthopaedic surgery: a review. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 129 (2009) 1651-1657
218. Van de Putte, K.A., Urist, M.R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 43 (1965) 257-270

219. van Gaalen, S.M., Kruyt, M.C., Geuze, R.E., de Bruijn, J.D., Alblas, J., Dhert, W.J. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue Eng Part B Rev* 16 (2010) 209-217
220. Vandeputte, K.A., Urist, M.R. Experimental Mineralization of Collagen Sponge and Decalcified Bone. *Clin Orthop Relat Res* 40 (1965) 48-56
221. Varady, P., Li, J.Z., Alden, T.D., Kallmes, D.F., Williams, M.B., Helm, G.A. CT and radionuclide study of BMP-2 gene therapy-induced bone formation. *Acad Radiol* 9 (2002) 632-637
222. Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P., et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1990) 2220-2224
223. 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
224. Watson, T.F. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. *British dental journal* 171 (1991) 287-291
225. Wei, C.M., Gibson, M., Spear, P.G., Scolnick, E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology* 39 (1981) 935-944
226. Wennerberg, A., Albrektsson, T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 25 (2010) 63-74
227. Wildemann, B., Lubberstedt, M., Haas, N.P., Raschke, M., Schmidmaier, G. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials* 25 (2004) 3639-3644
228. Wildemann, B., Schmidmaier, G., Ordell, S., Stange, R., Haas, N.P., Raschke, M. Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65 (2003) 150-156
229. Wilkins, K.E. Principles of fracture remodeling in children. *Injury* 36 Suppl 1 (2005) A3-11
230. Williams, J.K., Ellenbogen, R.G., Gruss, J.S. State of the art in craniofacial surgery: nonsyndromic craniosynostosis. *Cleft Palate Craniofac J* 36 (1999) 471-485
231. Winn, S.R., Uludag, H., Hollinger, J.O. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res* (1999) S95-106
232. Worgall, S., Wolff, G., Falck-Pedersen, E., Crystal, R.G. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 8 (1997) 37-44
233. Wozney, J.M., Rosen, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 1998 Oct;(355 Suppl):S66-72 (1998) 26-37
234. Yasko, A.W., Lane, J.M., Fellingner, E.J., Rosen, V., Wozney, J.M., Wang, E.A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone

- morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992) 659-670
235. Young, M.F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3 (2003) S35-42
236. Yu, Y.Y., Lieu, S., Lu, C., Miclau, T., Marcucio, R.S., Colnot, C. Immunolocalization of BMPs, BMP antagonists, receptors, and effectors during fracture repair. *Bone* 46 (2010) 841-851
237. Zapf, J., Hauri, C., Waldvogel, M., Froesch, E.R. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest* 77 (1986) 1768-1775
238. Zellin, G., Linde, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2 - An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Recons* 31 (1997a) 97-104
239. Zellin, G., Linde, A. Osteopromotive membranes and rhBMP-2 in tubular bone healing. *Journal of dental research* 76 (1997b) 1113-1113
240. Zellin, G., Linde, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *Journal of Biomedical Materials Research* 35 (1997c) 181-190
241. Zhao, M., Xiao, G., Berry, J.E., Franceschi, R.T., Reddi, A., Somerman, M.J. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 17 (2002) 1441-1451
242. Zhu, W., Rawlins, B.A., Boachie-Adjei, O., Myers, E.R., Arimizu, J., Choi, E., Lieberman, J.R., Crystal, R.G., Hidaka, C. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 19 (2004) 2021-2032
243. Zimmermann, T. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 95 (2005) 245-265
244. Zioncheck, T.F., Chen, S.A., Richardson, L., Mora-Worms, M., Lucas, C., Lewis, D., Green, J.D., Mordenti, J. Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human transforming growth factor beta 1 after topical and intravenous administration in male rats. *Pharm Res* 11 (1994) 213-220

8 Anhang

8.1 Absolutwerte

Tag	Gruppe	Perzentile		
		25%	50%	75%
6	BMP	2492,5	9012,5	16783
	Plasmid 2,5	3218,5	9173	15884,25
	Plasmid 12,5	2617,25	10168	14738
	Plasmid 25	7565,75	10340,25	16692,62
	Plasmid 50	528	1714	8238
	Plasmid 100	2930	4689	10150,5
13	BMP	12940,5	18480,5	28684
	Plasmid 2,5	5675,875	7775,5	12537,88
	Plasmid 12,5	5316,5	8483,5	11743,25
	Plasmid 25	7179	9989,5	12867,88
	Plasmid 50	11148	15713	23920
	Plasmid 100	8305,5	11624	23368,5
20	BMP	29537,5	43215,5	51673,5
	Plasmid 2,5	13870,375	25749,5	35952
	Plasmid 12,5	34806,75	39061	46347,25
	Plasmid 25	38956,375	42575,75	47778,88
	Plasmid 50	20777	29260	58090
	Plasmid 100	20706	28704,5	35009,5
27	BMP	15478,5	22606	28966,5
	Plasmid 2,5	9847,375	15518,25	24705,75
	Plasmid 12,5	10522,75	17977,5	24085
	Plasmid 25	15237,875	25190	30485,12
	Plasmid 50	6647,5	12195,5	17301
	Plasmid 100	10231,5	18708,5	24454,5

Tab. 8-1 Fläche des neu gebildeten Knochens in μm^2 an den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27

8.1.1 Signifikanzniveau der Absolutwerte

Tag 6	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,2674
Plasmid 12,5-BMP	0,6797
Plasmid 2,5-BMP	0,8947
Plasmid 25-BMP	0,6412
Plasmid 50-BMP	0,0346
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,4516
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,3399
Plasmid 25-Plasmid 100	0,0505
Plasmid 50-Plasmid 100	0,2931
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	1
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,5628
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,2505
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,3608
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0605
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0205

Tag 20	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,0625
Plasmid 12,5-BMP	0,8241
Plasmid 2,5-BMP	0,0081
Plasmid 25-BMP	0,7267
Plasmid 50-BMP	0,2498
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,1043
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,484
Plasmid 25-Plasmid 100	0,0138
Plasmid 50-Plasmid 100	0,6261
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,0588
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,3545
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,5006
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,0079
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,2391
Plasmid 50-Plasmid 25	0,2773

Tag 13	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,2674
Plasmid 12,5-BMP	0,0242
Plasmid 2,5-BMP	0,0003
Plasmid 25-BMP	0,0169
Plasmid 50-BMP	0,5165
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,191
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,0259
Plasmid 25-Plasmid 100	0,2466
Plasmid 50-Plasmid 100	0,5554
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,9247
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,6434
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,1223
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,3384
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,012
Plasmid 50-Plasmid 25	0,1688

Tag 27	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,1738
Plasmid 12,5-BMP	0,2664
Plasmid 2,5-BMP	0,0854
Plasmid 25-BMP	0,7708
Plasmid 50-BMP	0,0383
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,843
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,7991
Plasmid 25-Plasmid 100	0,1111
Plasmid 50-Plasmid 100	0,4887
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,8873
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,3545
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,4054
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,1637
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,4451
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0702

Tab. 8-2 Signifikanzniveaus der Absolutwerte der Fläche des neu gebildeten Knochens zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6,13, 20 und 27

8.2 Prozente absolut

Tag		Perzentile		
		25%	50%	75%
6	BMP	0,02902517	0,15107449	0,19092485
	Plasmid 2,5	0,06923173	0,14722795	0,23401925
	Plasmid 12,5	0,05588337	0,10701703	0,13399737
	Plasmid 25	0,08094057	0,1226728	0,15826227
	Plasmid 50	0,01013576	0,04312448	0,06461075
	Plasmid 100	0,05498347	0,07809013	0,10848187
13	BMP	0,15585037	0,19342498	0,23036545
	Plasmid 2,5	0,07161786	0,12217578	0,1913104
	Plasmid 12,5	0,10262168	0,11586377	0,13841789
	Plasmid 25	0,0781241	0,10978291	0,16552726
	Plasmid 50	0,19777005	0,2444073	0,29169644
	Plasmid 100	0,16542843	0,22790559	0,27697805
20	BMP	0,37343266	0,44074227	0,46711336
	Plasmid 2,5	0,31794362	0,38432681	0,46396334
	Plasmid 12,5	0,4678534	0,56496187	0,63417447
	Plasmid 25	0,4732792	0,49940712	0,52632083
	Plasmid 50	0,43988912	0,48365516	0,54493723
	Plasmid 100	0,37145096	0,41888481	0,49693328
27	BMP	0,16485182	0,2365387	0,31009236
	Plasmid 2,5	0,2357665	0,31907007	0,42338537
	Plasmid 12,5	0,22208149	0,25801664	0,27438494
	Plasmid 25	0,18239057	0,27374865	0,2988643
	Plasmid 50	0,12747251	0,16950963	0,26592022
	Plasmid 100	0,21417514	0,26874048	0,31994031

Tab. 8-3 Prozentuale Verteilung der Knochenneubildung zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27

8.2.1 Signifikanzniveau der Prozente absolut

Tag 6	p-Wert
Plasmid 12,5-BMP	0,6338
Plasmid 2,5-BMP	0,5428
Plasmid 25-BMP	0,9535
Plasmid 50-BMP	0,2018
Plasmid 100-BMP	0,4144
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,0523
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,663
Plasmid 25-Plasmid 100	0,0702
Plasmid 50-Plasmid 100	0,0545
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,2772
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,4179
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,2193
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,6634
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0109
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0205

Tag 20	p-Wert
Plasmid 12,5-BMP	0,039
Plasmid 2,5-BMP	0,1608
Plasmid 25-BMP	0,0546
Plasmid 50-BMP	0,0901
Plasmid 100-BMP	0,9499
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,3399
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,0746
Plasmid 25-Plasmid 100	0,1475
Plasmid 50-Plasmid 100	0,1178
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,014
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,4875
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,2505
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,0148
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0083
Plasmid 50-Plasmid 25	0,6639

Tag 13	p-Wert
Plasmid 12,5-BMP	0,0057
Plasmid 2,5-BMP	0,0245
Plasmid 25-BMP	0,0311
Plasmid 50-BMP	0,0569
Plasmid 100-BMP	0,4388
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,0068
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,0126
Plasmid 25-Plasmid 100	0,0169
Plasmid 50-Plasmid 100	0,4571
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,5083
Plasmid 25-Plasmid 12,5	1
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,0017
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,5716
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0016
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0059

Tag 27	p-Wert
Plasmid 12,5-BMP	0,9241
Plasmid 2,5-BMP	0,0854
Plasmid 25-BMP	0,7708
Plasmid 50-BMP	0,3464
Plasmid 100-BMP	0,217
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,4451
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,5006
Plasmid 25-Plasmid 100	0,828
Plasmid 50-Plasmid 100	0,0333
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,1706
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,4875
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,3219
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,2963
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0156
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0822

Tab. 8-4 Signifikanzniveaus der prozentualen Verteilung des Knochenwachstums zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6,13, 20 und 27

8.3 Prozente kumulativ

Tag		Perzentile		
		25%	50%	75%
6	BMP	0,02902517	0,15107449	0,19092485
	Plasmid 2,5	0,06923173	0,14722795	0,23401925
	Plasmid 12,5	0,05588337	0,10701703	0,13399737
	Plasmid 25	0,08094057	0,1226728	0,15826227
	Plasmid 50	0,01013576	0,04312448	0,06461075
	Plasmid 100	0,05498347	0,07809013	0,10848187
13	BMP	0,22096056	0,37003231	0,42004607
	Plasmid 2,5	0,26390595	0,30672388	0,35734333
	Plasmid 12,5	0,17929219	0,23548027	0,2588931
	Plasmid 25	0,20393955	0,25586385	0,28951132
	Plasmid 50	0,27659094	0,3018322	0,3374087
	Plasmid 100	0,2204119	0,33061118	0,36694004
20	BMP	0,68990764	0,7634613	0,83514818
	Plasmid 2,5	0,57661463	0,68092993	0,7642335
	Plasmid 12,5	0,72561506	0,74198336	0,77791851
	Plasmid 25	0,7011357	0,72625135	0,81760943
	Plasmid 50	0,73407978	0,83049037	0,87252749
	Plasmid 100	0,68005969	0,73125952	0,78582486

Tab. 8-5 Kumulative prozentuale Verteilung der Knochenneubildung zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6, 13, 20 und 27

8.3.1 Signifikanzniveau der Prozente kumulativ

Tag 6	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,4144
Plasmid 12,5-BMP	0,6338
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,663
Plasmid 2,5-BMP	0,5428
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,0523
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,2772
Plasmid 25-BMP	0,9535
Plasmid 25-Plasmid 100	0,0702
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,4179
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,6634
Plasmid 50-BMP	0,2018
Plasmid 50-Plasmid 100	0,0545
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,2193
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0109
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0205

Tag 20	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,217
Plasmid 12,5-BMP	0,9241
Plasmid 2,5-BMP	0,0854
Plasmid 25-BMP	0,7708
Plasmid 50-BMP	0,3464
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,5006
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,4451
Plasmid 25-Plasmid 100	0,828
Plasmid 50-Plasmid 100	0,0333
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,1706
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,4875
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,3219
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,2963
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,0156
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0822

Tag 13	p-Wert
Plasmid 100-BMP	0,3464
Plasmid 12,5-BMP	0,0703
Plasmid 2,5-BMP	0,3825
Plasmid 25-BMP	0,1157
Plasmid 50-BMP	0,9499
Plasmid 12,5-Plasmid 100	0,1655
Plasmid 2,5-Plasmid 100	0,8238
Plasmid 25-Plasmid 100	0,1688
Plasmid 50-Plasmid 100	0,8576
Plasmid 2,5-Plasmid 12,5	0,0588
Plasmid 25-Plasmid 12,5	0,5628
Plasmid 50-Plasmid 12,5	0,0157
Plasmid 25-Plasmid 2,5	0,0896
Plasmid 50-Plasmid 2,5	0,8238
Plasmid 50-Plasmid 25	0,0597

Tab. 8-6 Signifikanzniveaus der kumulativen prozentualen Verteilung des Knochenwachstums zu den Untersuchungszeitpunkten an den Tagen 6,13, 20 und 27

9 Danksagung

An erste Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Andreas Kolk für die Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die fortwährende Unterstützung und Motivation bedanken.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Herrn Dr. Bissinger und Herrn Dr. Stöhrer für die gute Zusammenarbeit und die Herstellung der histologischen Präparate danken. Ferner danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Christoph Pautke für die Unterstützung und Beratung.

Frau Dr. med. vet. Hazek vom Lehrstuhl für experimentelle Onkologie der Technischen Universität München danke ich sehr für die Betreuung der Versuchstiere, insbesondere für die lange und aufwändige postoperative Kontrolle und die Anleitung und Durchführung der polychromen Sequenzmarkierung.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Dr. Alexander Hapfelmeier vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München.

Dem IMETUM und insbesondere Frau Susanne Schnell-Witteczeck und Frau Ursula Hopfner danke ich für die Einweisungen in die Fluoreszenzmikroskope und das CLSM im Rahmen der Vorversuche zur Erarbeitung des Färbeschemas und der Auswertungsalgorithmen.

Frau Dr. Hanna Engelke vom Institut für Physik der Technischen Universität München danke ich für die Einweisung und die Möglichkeit der Nutzung des Fluoreszenzspektrometers.

Ein ganz besonderer Dank geht an Light Microscopy Centre der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich und insbesondere an Frau Dr. Justine Kusch und Herrn Dr. Gábor Csúcs für die Möglichkeit das CLSM der Einrichtung zu nutzen und intensiv in die Benutzung eingewiesen worden zu sein.

Ganz herzlich Danke ich Frau Anna-Maria Hauber für die Motivation und den Beistand bei der Erstellung der Arbeit, aber auch für die schöpferischen Pausen wenn es nötig war.

Meinen Eltern Frau Katrin Kreutzer und Herrn Michael Kreutzer möchte ich von ganzem Herzen für die ungebrochene geistige und weltliche Unterstützung, aber ganz besonders für den dezenten und unablässigen Druck danken, welche diese Arbeit erst ermöglicht haben.

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Kreuzer
 Vorname: Kilian
 Geburtsdatum: 22. März 1977
 Geburtsort: Hamburg

Schulbildung:

1983 – 1987 Grundschule Lohkampstraße, Hamburg
 1987 – 1996 Gymnasium Dörpsweg, Hamburg
 1993 – 1994 South Kent School, Connecticut, USA
 1996 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

1996 – 1997 Grundwehrdienst

Hochschulstudium:

09/1997 Immatrikulation an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. im Studiengang Zahnmedizin
 10/1998 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
 04/2000 Zahnärztliche Vorprüfung
 04/2003 Immatrikulation an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. im Studiengang Medizin
 08/2003 Zahnärztliche Prüfung
 08/2003 Zahnärztliche Approbation
 03/2004 Ärztliche Vorprüfung
 04/2004 Exmatrikulation an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. im Studiengang Medizin
 05/2004 Immatrikulation an der Technischen Universität München im Studiengang Medizin
 09/2006 Promotion zum Dr. med. dent.
 05/2008 Ärztliche Prüfung
 05/2008 Ärztliche Approbation
 seit 06/2008 Ärztlicher Mitarbeiter in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K.-D. Wolff)